

生命科学实验指南系列

# Gene Transfer

Delivery and Expression of DNA and RNA
a Laboratory Manual

# 基因转移

## ——DNA 和RNA 的转运与表达

[美] T.畅弗里德曼 J.畅罗西 主编
殷勤伟 等 译



科学出版社

(Q-2056.31)

## 生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



本书彩插及
更多信息请扫码



ISBN 978-7-03-047486-5

定价（全套）：4500.00元

生命科学实验指南系列·典藏版

# 基 因 转 移

——DNA 和 RNA 的转运与表达

〔美〕T. 弗里德曼　J. 罗西　主编

殷勤伟 等　译

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2007-4868 号

## 内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, by Theodore Friedmann and John Rossi.



**图书在版编目（CIP）数据**

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000

**定价：4500.00 元**

(如有印装质量问题，我社负责调换)

# 译 者 序

早期的遗传学认为基因的转移只能是从亲代向子代的垂直传递，但近年来，研究者们越来越清楚地认识到水平方向的基因转移也是自然发生的。微生物可通过多种途径进行横向的基因转移，这种转移不仅发生在不同的微生物细胞之间，而且也发生在微生物与高等动植物之间。基因转移是外源性有功能的遗传信息进入细胞甚至整个生物体内的复杂过程。基因转移的技术可分为物理法、化学法和生物法三大类。物理法包括：微束激光打孔法、基因枪法、DNA 直接注射法、显微注射法、电穿孔法和 DNA 微粒子轰击法等。化学法包括：磷酸钙沉淀法、葡聚糖法、多聚体导入法、脂质体融合法和受体介导法等。生物法包括：反转录病毒载体系统、慢病毒载体系统、腺病毒载体系统、痘苗病毒载体系统和单纯疱疹病毒载体系统等。这些技术都为基因转移的研究和应用作出了重要的贡献。

瑞典皇家科学院 2007 年 10 月 15 日宣布，将 2007 年诺贝尔生理学或医学奖授予美国犹他大学 Eccles 人类遗传学研究所的科学家马里奥·卡佩奇（Mario R. Capecchi）、美国北卡罗来纳州大学教会山分校医学院的教授奥利弗·史密西斯（Oliver Smithies）与英国科学家卡迪夫大学卡迪夫生命科学学院的马丁·埃文斯（Martin J. Evans）。他们因基因敲除小鼠的开创性研究而获得此奖项。他们发现了胚胎干细胞中染色体能与导入 DNA 发生同源重组，通过同源重组，有缺陷的靶基因可被导入的 DNA 定点修正或改造，从而能产生由改造基因参与的生物模型。目前，国际上已有大约 5000 种基因敲除的小鼠，这些模型可进一步用于基因功能和遗传性疾病的系统而深入的研究。基因靶向技术也是基因转移技术的一种。可以预见基因转移技术一定还会给人们带来新的惊喜。

基因转移技术不但革新了生物学和医学中许多基本问题的研究，也推动了诊断和治疗方面的分子技术发展，并使基因治疗成为可能。基因治疗是一种以预防和治疗疾病为目的的人类基因转移技术，是以改变人的遗传物质为基础的生物医学疗法。虽然目前世界上肿瘤基因治疗是基因治疗研究的热点，但是基因治疗还不能作为一种成熟的治病方法用于临床。它的进一步发展还有待于基因转移技术，尤其是靶向载体的研制和完善。尽管如此，基因转移技术已广泛用于基因的结构和功能分析、基因表达与调控和转基因动物等的研究。另外，从 20 世纪 80 年代后期开始，在农业、畜牧业和水产养殖业中，也逐渐引进了基因转移技术，出现了高产、优质、抗虫和抗病的转基因植物和转基因动物品系，如全世界转基因作物已达 120 多种，在美国，转基因食品高达 4000 多种。这充分表明了基因转移技术在基础研究和实际应用方面的深远意义和社会价值。

可喜的是基因转移技术在我国也得到了很大程度的发展，但由于许多方法，尤其是大多数非病毒技术近年来发展很快，所以通过这本书系统而详尽地介绍这些新技术就显得非常重要。本书由 180 位此领域的专家和学者执笔，对 70 多种基因转移技术的基本原理和实施方案进行了深入浅出的描述，是目前最为全面的介绍基因转移技术和方法的

专业书籍。本书由中国科学院生物物理研究所殷勤伟研究员、清华大学深圳研究生院生命科学部张雅欧教授、中国医学科学院生物医药技术研究所邵荣光研究员和中国科学技术大学化学院王均教授主持翻译，一些博士和硕士研究生也参与了部分工作。最后，由殷勤伟研究员进行了统一审校。希望此书能为我国的基因转移技术的研究和应用发挥一定的作用。

由于时间紧迫和水平有限，在翻译中难免有欠缺，敬请读者批评指正。

殷勤伟

于中国科学院生物物理研究所

2007 年 10 月

# 前　　言

1890 年德国的细菌学家和生理学家罗伯特·科赫（Robert Koch）确立了 4 大准则，即著名的 Koch 定律。此定律常被用来判断一种疾病的感染原因是否正确无误。尽管这些准则仍持续被用作鉴定一种微生物和一种人类疾病之间必然联系的基本要素，但我们现在已认识到存在着某些例外。科赫认为引起一种疾病的可疑微生物应该能够在此疾病的每一种情况下，从所有被感染的患者中以单纯的形式被培养和鉴定。当这种纯化的微生物被引入一个非感染的有机体中时，相应的疾病应能再次产生。最后，应该可以从被感染的有机体中再次获得这种微生物。一直到 20 世纪中叶，遗传学大体上只是一种描述性科学。科赫的方法使对人类疾病的研究从简单的描述转变成更为严谨的实验科学。

随着 20 世纪医学遗传学和分子遗传学的快速发展，一套相似的标准被用来确认一种遗传机制和一种人类生理或病理特征之间的关系。阿奇博尔德·伽罗德（Archibald Garrod）于 1908 年在对英格兰皇家学会的克鲁尼安（Croonian）的著名演讲中引入了化学病理学的概念，他指出遗传信息的错误是导致人类遗传性疾病（叫做先天性新陈代谢紊乱）的根本原因。

20 世纪初，托马斯·亨特·摩尔根（Thomas Hunt Morgan）和他的助手在著名的哥伦比亚大学的果蝇实验室里创立了基因连锁的概念，发现了果蝇的遗传因子和表型特征之间的关系，指出遗传信息能够支配活的有机体的发育特征和特定性状。然而，直到 1940 年，人们才有可能鉴定正常和病理性状的遗传特征的特定的分子基础。在 1941 年，乔治·比德尔（George Beadle）和爱德华·塔特姆（Edward Tatum）的研究揭示了放射诱导的粗糙脉孢霉营养缺陷型是一种特异的代谢紊乱，他们认为正常的或突变的基因决定或编码一个正常的或异常的酶。这一发现亦为伽罗德的先天性新陈代谢紊乱的概念提供了证据。到 1944 年，奥斯瓦德·艾弗里（Oswald Avery）、马克林·麦卡第（Maclyn McCarty）、柯林·麦克劳德（Colin McLeod）通过一系列的精确实验指出能从肺炎球菌的遗传物质就是 DNA 分子，它可将受体株的特性转化成供体株的特性。这一发现也证明了 DNA 确实决定着一个微生物所有的遗传特征。继而在 1952 年，阿弗雷德·赫尔希（Alfred Hershey）和马莎·蔡斯（Martha Chase）开展了一系列有关噬菌体介导的基因转移实验，揭示了噬菌体的遗传决定因子也是 DNA，从而进一步论证了 DNA 是遗传信息载体的假说。

1953 年詹姆斯·沃森（James Watson）和弗朗西斯·克里克（Francis Crick）对 DNA 分子三维结构的发现清楚地阐明了 DNA 是怎样编码和储存遗传信息的，并揭示了 DNA 是怎样复制的分子机制。继而其他的发现接踵而来。在接下来的二十年中，弗雷德里克·桑格（Frederick Sanger）证实了蛋白质由特定的氨基酸序列组成。弗农·英格拉姆（Vernon Ingram）和他的同事确定了遗传错误是人类先天性疾病的原因，揭示了这些改变是怎样通过产生异常氨基酸序列的蛋白质而发生的。随后进入了分子生物

学的“黄金时期”，从20世纪50年代到70年代掀起了一股对遗传信息流的研究热潮。紧接着的是数十年的令人惊讶并且非常成功的“基因组计划”。这些发现共同阐明了决定所有生命系统的正常和异常功能的遗传机制。

在科赫原则的精神中，关于当代分子遗传学的概念应是正常和疾病相关基因表达的假设机制需要得到生物功能的证实。在最后的分析中，要确证一种不确定的遗传机制需要有能联系基因型和表型的重复性实验的可靠支持。在很多情况下，通过在生物体内引入特定的遗传改变或阻碍遗传信息功能的表达，以及对所产生的表型进行分析能提供明确的证据。这些研究依赖于引导外源遗传信息到细胞，甚至到整个生物体内的技术方法的发展。暂时地或永久地修改一个生物体的基因型的方法为我们增进对非常复杂的遗传学机制的了解提供了更多的新机遇。从更现实的意义上说，这些方法甚至可被设想为一种“基因疗法”，将被用来纠正疾病治疗范畴中的各种遗传紊乱。

本书提供了许多有特色的将外源性有功能的遗传信息引入哺乳动物细胞甚至整个生物体内的方法和技术。许多章节提供了背景知识和描述许多病毒的或非病毒的基因转移载体和技术的详细方案。方案是逐步、以“食谱”似的方式来展现的。因此，每一个研究者都能切实可行的利用基因转移/表达系统。除了基因转移外，本书还有一些研究遗传信息的调控基因表达的方案。任何一个给定的实验模型或基因治疗方案在这都能找到许多实现遗传物质导入和表达的方法。为了引导读者选择合适的系统，我们在每一章节中描述了该方法的优点和缺点。显然，在一个如此快速发展的领域中，将会持续出现新方法去补充甚至取代一些旧方法。尽管如此，这本书里的技术包含了许多当前用于哺乳动物细胞和组织基因转移的常用方法。

我们感谢那些在冷泉港实验室出版社中为本书出版作出贡献的人——出版社执行理事约翰·英格里斯（John Inglis）；组稿编辑大卫·柯罗帝（David Crotty）；编辑开发部经理简·阿根廷（Jan Argentine）。我们也感激出版社编辑员工的辛勤努力，如始发和监督此项目的卡任·詹森（Kaaren Janssen）、伊内兹·萨里诺（Inez Sialiano）和谢尔·麦特斯（Cher Mattes），还有开发编辑伊润·皮驰（Irene Pech）、马丁·温尼（Martin Winer）和特雷西·库曼（Tracy Kuthlman）。我们还要感谢丹尼斯·韦斯（Denise Weiss）、丽纳·司提优（Rena Steuer）、道提·布朗（Dotty Brown）和劳伦·海勒（Lauren Heller）的技术工作。

我们希望这本书能够成为任何想利用基因转移作为研究或治疗工具的科研人员手中有用而方便的标准的实验室手册。

T. 弗里德曼<br>J. 罗西

# 目　　录

# 第一篇　病毒载体

# 第一章 导 言

Theodore Friedmann[*] 和 John Rossi[†]
[*] University of California, San Diego; [†]Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California 92093-0634
殷勤伟 译

将外源遗传物质引入哺乳动物细胞的技术可方便地分为病毒的和非病毒的两类方法，这也是本书大体的分类方法。每一种方法都有其优缺点，而且都能在实验室和现今的临床中找到其重要的应用。没有一种单独的载体适合于所有的基因转移用途，尽管最受宠爱的载体系统不断地得宠又失宠，但大多数的系统或多或少亦起着有用而重要的作用。当然，自然界在科学家之前设计、进化了一些中介，如病毒，可将外源遗传信息转移到原核和真核生物细胞中去。这些病毒的工作目的就是以最可能有效的方式把自身的基因组转移到宿主细胞中，主要以为了达到繁殖自己的自私进化为目的，但同时也常引起宿主损伤的负效应。

虽然我们知道病毒性疾病已经很长时间了，但在 20 世纪的下半个世纪分子遗传学出现之前，我们不可能在分子机制水平上去了解它们。然而，即使我们不知道如此详细的知识，也有可能凭借直觉去了解人类疾病的祸首并利用这种原始的理解去寻找控制病毒疾病的方法。在 1796 年，英国医师爱德华·詹纳虽然不知道病毒和自然免疫之间的关系，但是他根据对感染牛痘的牛奶女工很少患天花现象的观察，经过尽心地思考，采用牛痘物质来感染一个男孩以帮助他预防天花。即使如此，我们现在才明白这是基因由病毒转移到了牛奶女工细胞中的结果。

对基于病毒的基因转移机制和效应的进一步分子本质的了解开始于 20 世纪 60 年代中期的罗纳托·杜尔贝科（Renato Dulbecco）和他的同事的研究（Sambrook et al. 1968），他们发现乳头多瘤病毒 SV40 和多瘤病毒能通过整合自身基因拷贝到所感染的宿主细胞中去诱导被感染的细胞发生持久的甚至瘤性的改变。如果天然的病毒有能力作为转移自身基因的载体，那么在不引起细胞毒性的前提下，不也能设计出转移其他基因到哺乳动物细胞中去的工程病毒吗？1973 年重组 DNA 技术出现以后，在 20 世纪 80 年代早期，随着第一个反转录病毒载体的构建成功（Shimotohno and Temin 1981；Wei et al. 1981；Tabin et al. 1982），这种可能性变成了现实。

病毒载体确实是有效的，但是它们常常具有细胞毒性、免疫原性和生物危险性，这些严重而潜在的缺点会给一些基因转移实验带来问题。这就产生了对研发化学或合成载体的需求。希望这些非病毒载体既有类似病毒载体的转移效率，而又无病毒载体的缺陷。几十年来，研究者不断地改进转染外源基因的低效率方法，并利用阳离子或多胺来改善负电荷的核酸穿过负电荷的细胞膜的能力。在 1973 年，弗兰克·格雷厄姆（Frank Graham）和亚历山大·范德艾布（Alexander van der Eb）发现腺病毒 DNA 与磷酸钙

共沉淀能显著提高细胞吸收和转染效率。此后，非病毒的基因转移方法得到了快速的发展。

尽管本书中讨论的许多其他的非病毒方法有更新的发展，但磷酸钙法仍然是哺乳动物细胞转染的基础方法之一。总体来说，与病毒方法比较，即使更好的非病毒方法也遭受着低转染效率和转染基因表达稳定性低的困扰。这至少要部分归结于一个事实，即病毒能将引入的基因包装进一个能识别并吸附到靶细胞表面特定位点的小包裹里面，包裹能以免遭细胞降解的途径将载体和负载基因转移到合适的细胞位点里去。

书中描述的许多方法，尤其是大多数非病毒技术，都处于发展的早期阶段，就长远来说，其中许多可能只能有限而特定的应用。为了变得确实实用，未来的基因转移方法应该提供比现今方法更多的重要优点。这些优点，尤其对体内基因转移来说，应该包括能够选择用于基因转移的特定靶细胞或靶组织的能力，这是一个目前大多数基因转移方法仍然缺乏的能力。更进一步讲，在整合载体的情况下，通过发展特化基因组整合位点的方法来清除体内基因转移常遇到的安全性和高效性的重要障碍，并因此避免插入突变引起的不可避免的细胞破坏。除此之外，用一种在靶序列中制造特异序列改变的方法代替混杂添加遗传信息的方法能使一种打了就跑的方法不留载体痕迹地修改所要改变的基因。这种技术在最近已经出现了。它通过研发含有锌指结构元件的载体，从而能定义一个转基因和特定靶基因组的相互作用位点（Porteus and Carroll 2005）。最后，产生哺乳动物细胞遗传改变的方法对天然状态来说不是充分可靠的，除非它们包含了一整套能限定靶位点天然表达的调控元件。这就常常要求插入一长段包含调控信息的遗传物质。由于载体在运载遗传信息量上有很大的差异，所以这种独特的要求就指定了那些最适合这些遗传信息转移的载体系统。

本书收集的方案为向哺乳动物细胞进行基因转移提供了至今最为广泛的技术和方法的选择。除了基因转移方法之外，还有一些有关调控基因表达的方案。我们的目标是为科技界提供一本实用的有关基因转移和表达的好指导，它包括实证过的老方法，又含有许多令人振奋的新技术。我们相信这些方案在使用中会经受得起时间的考验。

## 参考文献

Graham F.L. and van der Eb A. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456–467.

Porteus M.H. and Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **23:** 967–973.

Sambrook J., Westphal H., Srinivasan P.R., and Dulbecco R. 1968. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **60:** 1288–1295.

Shimotohno K. and Temin H.M. 1981. Formation of infectious progeny virus after insertion of he herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* **26:** 67–77.

Tabin C.J., Hoffmann J.W., Goff S.P., and Weinberg R.A. 1982. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **2:** 426–436.

Wei C., Gibson M., Spear P.G., and Scolnick E.M. 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene from Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **39:** 935–944.

# 第二章　反转录病毒载体

Kenneth Cornetta[*]，Karen E. Pollok[†] 和 A. Dusty Miller[‡]

[*] Department of Medical and Molecular Genetics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202;[†] Department of Pediatrics, Section of Pediatric Hematology/Oncology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202;[‡] Divisions of Human Biology and Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98109

赵建明　译



## 摘要

本章主要讲述那些最初被发现的源自 γ-retroviral 种属的反转录病毒载体，由于它们都来自致癌反转录病毒家族并且都具有简单的 *gag-pol-env* 基因组的结构，因此也被称为癌反转录病毒载体或简单反转录病毒载体。除了这种反转录病毒载体家族外，还有更为复杂的反转录病毒载体，如慢病毒和泡沫病毒载体。这些病毒除了含有标准的 *gag-pol-env* 基因外还包含多种附属基因。

反转录病毒在实验室研究和临床应用上亦有很大的优势，和其他病毒比起来反转录病毒能够高效地整合到被感染细胞的基因组中。同样，由反转录病毒携带的转基因也能整合进靶细胞，并通过基因的复制传给靶细胞的所有子细胞，使这些载体成为改造干细胞、祖细胞或那些被期望能在体内大量扩增的细胞（如免疫应答刺激的 T 细胞）的理想工具。此外，反转录病毒转移基因的效率要比非病毒载体转移基因的效率高得多。更重要的是，这种载体在大多数实验室都能很容易地被构建并被大规模地生产，因此它也

适合应用于临床。

反转录病毒载体在基因治疗应用上也有一些不利因素。首先，它们还不能用于全身给药，因为它们常被用于体外的细胞转导而易于被人血液中的蛋白质和细胞组分所灭活。第二，它们需要细胞的分裂才能进行整合。第三，当计算用这种基因导入方法的风险和利率时，我们还要考虑到基因有可能在整合进入造血细胞的同时又引起癌基因的激活，虽然这是一个很少发生且复杂的过程。尽管有这些限制，反转录病毒载体系统仍然是一个定义完善的系统，并且在过去 20 年里通过广泛的使用，已造就了许多新型的试剂与其配套，它们乃是将转基因序列整合进入靶细胞的一个具有很大魅力的系统。

## 引言

### 反转录病毒作为基因导入的工具

反转录病毒能非常好地被用来作为基因导入的工具是因为它们有特定的生命周期和能有效整合进入靶细胞 DNA 的能力。反转录病毒的基因组两侧连接着两个调控区，也被称作长末端重复序列（LTR），具有启动子和增强子的功能并且也是整合进入宿主基因所必需的。它还有一个包装序列（ψ）有利于病毒 RNA 进入病毒的包装子。另外三个病毒基因组区域是：编码病毒结构蛋白的基因 *gag*；编码酶包括反转录酶和整合酶的 *pol*；编码病毒囊膜糖蛋白的 *env*，这种糖蛋白能和靶细胞上特异受体相结合来帮助病毒的感染。病毒衣壳内有两套病毒的基因组 RNA、反转录酶和整合酶。携带的酶基因能让病毒感染细胞，以病毒的 RNA 为模板反转录 DNA 并且不用表达任何病毒基因就能整合进入细胞基因组。反转录病毒的这种特性，让我们有可能将病毒编码蛋白的基因（*gag*、*pol*、*env*）删除替换成我们感兴趣的外源基因（图 1）。这导致载体复制缺陷和引起将载体 RNA 包装成病毒体的一个技术问题。这个问题能通过瞬时转染表达病毒基因的质粒和表达载体基因组的质粒来解决（图 2），或者更简单地，用一个反转录病毒包装细胞系来克服，这些我们下面将详细讨论。

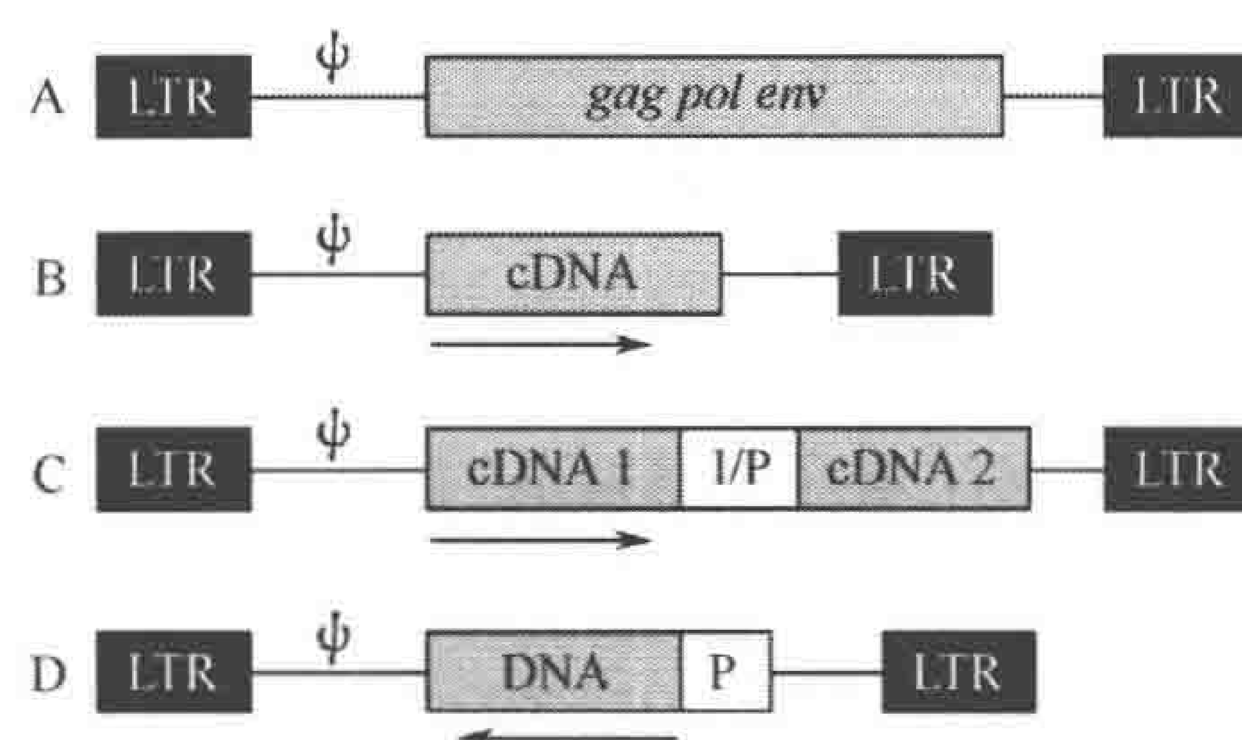



图 1. 反转录病毒载体设计。A. Moloney 鼠白血病代表性概图。LTR 位于三个病毒基因区域：*gag*、*pol* 和 *env* 的两侧，LTR 包含着启动子和增强子的功能，有效包装病毒 RNA 成病毒体需要 Psi（ψ）序列。B. 一个载体结构保留 LTR 和 ψ 序列，缺失主要的病毒基因区域。在5′LTR的启动子被用来表达所要的 cDNA。C. 通过使用一个内在的核糖体进入位点（IRES）序列（I）或者引入一个次级的启动子（P）来表达多个基因或者序列。D. 当要表达序列包含内含子或者其他干预一个完全长载体的转录序列时，可反向地将其插入。这允许完全长度的转录子被包装进入病毒体，所要的基因在整合进靶细胞后被表达。箭头表示基因的方向。

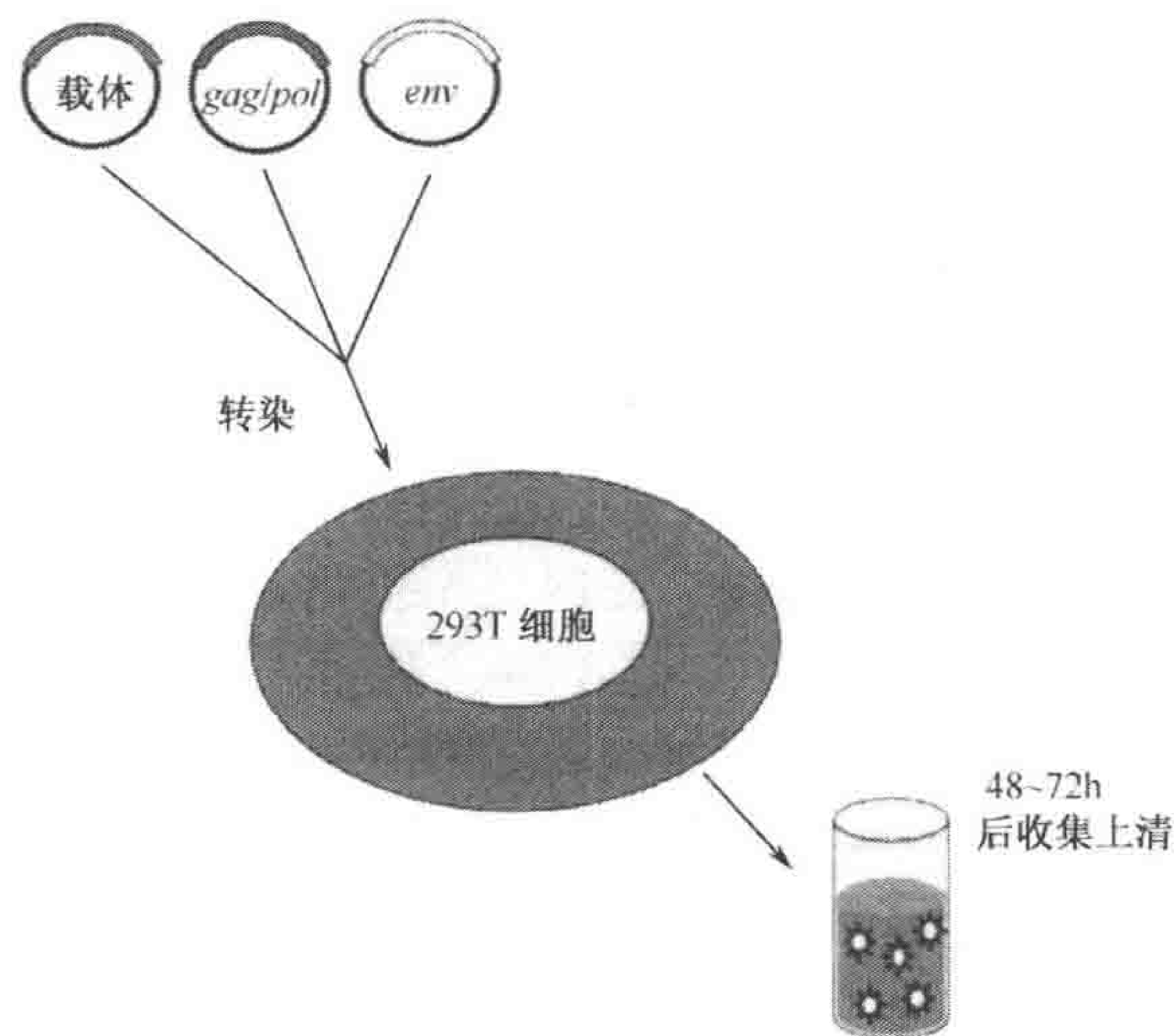



图 2. 通过瞬时转染产生载体。利用磷酸钙、脂质体或电击的方法将表达载体、病毒 *gag* 与 *pol* 基因和病毒包膜的质粒转入能够高效转染的细胞（如 HEK 293T 细胞），48～72h 后收获载体溶液，它们可被立即使用或冷藏在－70℃，供日后使用。

## 反转录病毒载体设计时需注意的问题

在构建反转录病毒载体时有一些重要问题是我们必须要考虑的。载体有两个主要组成部分：载体的骨架和转基因盒。如图 1 中，载体骨架序列来源于反转录病毒。早期大多数研究主要是应用那些来源于 Moloney 鼠白血病病毒（Mo-MLV）的载体。在大多数细胞系和不同的原代细胞中，Mo-MLV LTR 的启动子和增强子都能够启动表达。但是 Mo-MLV LTR 在植入像前胚胎细胞、胚胎干细胞和原始造血干细胞等一些原代细胞中却不能很好地表达（Jahner et al. 1982；Challita and Kohn 1994）。后来的研究表明 Mo-MLV LTR 和引物结合位点至少有 4 个沉默子元件，这种沉默机制是复杂的，不能完全解释清楚，但却促使很多科研人员开始用其他的病毒或对沉默元件序列进行突变来构建新型的载体（Pannell and Ellis 2001）。在过去的 15 年里，已经出现了很多新的载体，其上的 LTR 能够在一些特定的细胞类型中表达（如骨髓造血细胞），而且也很少在体内被甲基化或其他细胞机制所沉默（Hawley 2001）。研究人员现在也找到了很多种在原始细胞内能表达的新型载体，但也只是减少而不能完全消除反转录病毒载体的沉默效应。

选择好载体的主要骨架后转基因盒就可以插入了，最简单的设计是利用 LTR 启动子来表达转基因。一般来说，转基因的序列是没有内含子的以防止在 RNA 加工过程中被剪切。在一些情况下，如转基因中内含子序列对于转基因的表达是重要的或者需用组织特异性启动子来进行与病毒 LTR 相关的非特异表达时，转基因盒能够以相反的方向插入（图 1）。

最近，很多文献都报道了由于反转录病毒插入引起的突变会导致恶性肿瘤的发生，因此现在很多的载体设计都在考虑这方面的问题。这种突变通常是因为载体的调控序列

（一般是增强子序列）整合到一些敏感的癌基因附近导致了这些基因的过表达。现已认为插入突变亦能引起癌基因和（或）抑癌基因发生改变。由 Mo-MLV 病毒感染引起的 T 细胞淋巴瘤的每个细胞里有多个病毒整合位点。具有增殖能力的 γ-retroviral 在非人类的灵长类动物中被发现确实能够引起恶性肿瘤。但是单一的整合引起插入突变的风险（典型的在反转录病毒载体中出现的）却是非常低的（Cornetta 1992；Li et al. 2002）。直到最近反转录病毒载体临床试验才有报道引起插入突变的事例；在对 11 位患有 X 连锁重症联合免疫缺陷病（SCID）的患者进行基因治疗的测试中，至少有两位患者的 *LM02* 基因附近具有单一载体的整合，而同时患上白血病（Cavazzana-Calvo et al. 2000；Hacein-Bey-Abina et al. 2002，2003a，b）。这些孩子患病的原因虽然是很复杂的，但初步的证据表明在这项研究中转基因也扮演了癌基因的角色。新的数据表明，不同的 LTR 可能有不同的致癌潜能，将被开发的新型载体将运用自我失活的载体设计来消除增强子序列。理论上，这些新的载体会有较高的安全性，但是它们需要有其他的调控区域来启动转基因的表达。这些关注也要考虑到绝缘序列、核基质附着区、座位控制区域。这些序列需要有能力来避免周围遗传序列产生不受欢迎的活跃，并可以保护转基因盒不会被由于整合位点相关的位置效应而沉默。

## 在选择反转录病毒载体包装细胞系时应考虑的问题

从第一个反转录病毒载体包装细胞系被描述以来，已经有很多个包装细胞系产生了（Mann et al. 1983；Watanabe and Temin 1983）。选择包装细胞的关键因素是：①能被转导的细胞类型的范围，这主要由包装细胞产生的 Env 蛋白所决定；②细胞产生增殖型病毒（也叫辅助病毒）的倾向，这是一个早期包装细胞系的主要问题，现在基本上已被新的设计所解决；③由包装细胞产生的病毒对人血清失活的敏感性，这在基因治疗上很重要；④将内源的反转录病毒序列共包装进入病毒体的问题（尤其是鼠细胞来源的包装细胞），这也是在基因治疗应用上需要考虑的。

表 1 列出了通常应用的包装细胞系的种类。对于标准的实验室应用，包装细胞系的典型选择使产生的病毒应该能导入广泛的哺乳动物和鸟类的细胞系，如 PT67 细胞。另外，如要转移具有潜在危险的癌基因，研究人员应该找那些产生的载体仅能导入老鼠细胞而不能导入人类细胞的包装细胞系，如 GP＋E-86 细胞系。在遗传学研究上，PG13 细胞系具有很有用的特性，因为这些细胞产生的载体不会再感染包装细胞，不像其他包装细胞在培养期间要被再感染。

生成稳定的产生载体的包装细胞，最好的办法是感染一个包装细胞系再用产生的病毒导入第二包装细胞系。然后，用第二包装细胞系检测载体的存在、克隆分离、分析存在的载体的完整单拷贝。从这些细胞产生的载体库都应该尽可能的相似和同源，因为载体病毒的基因组 RNA 都是从一个单一稳定完整的病毒前体上产生的。相反，从那些稳定或瞬时转染的包装细胞产生的载体都是一些异源性的，因为载体 RNA 是从被再排列产生的多个载体拷贝上得到的。下面的操作指导就是描述怎样得到稳定的产生载体的细胞。我们先以瞬时转染 PE501 包装细胞然后再导入 PT67 细胞为例。病毒转导二级包装细胞的能力对于选用一个转染的包装细胞系是很重要的，由于 Env 蛋白在包装细胞能结合和封闭由这个 Env 蛋白进入细胞所需的受体，却不能封闭其他 Env 蛋白所使用的

其他的细胞表面受体。我们这个例子当中，PT67 细胞产生的 10A1Env 蛋白能结合 Pit1 和 Pit2 受体，不能结合在 GP+E-86 包装细胞中病毒产生的 Cat1 受体，想要更详细的讨论这些病毒种类可以参考 Overbaugh 等（2001）。

**表 1. 常用的反转录包裹细胞系**

| Env 蛋白来源 | 细胞株 | 亲代细胞株 | 被表达的标记基因 | 来源 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ecotropic MLV | PE501 | NIH-3T3 小鼠 | *tk* | 作者 | Miller and Rosman 1989 |
| | GP+E-86 | NIH-3T3 小鼠 | *gpt* | ATCC CRL-9642 | Markowitz et al. 1988 |
| 双嗜性 MLV | PA317 | NIH-3T3 小鼠 | *tk* | ATCC CRL-9078 | Miller and buttimore 1986 |
| | ProPak-A | 293 人 | *hpt*, *pac* | ATCC CRL-12479 | Forestell et al. 1997 |
| | FLYA | HT-1080 人 | *bsr*, *ble* | 作者 | Cosset et al. 1995 |
| 10A1 MLV | PT67 | NIH-3T3 小鼠 | *tk*, *dhfr** | BD Biosciences ATCC CRL-12284 | Miller and Chen 1996 |
| GALV | PG13 | NIH-3T3 小鼠 | *tk*, *dhfr** | ATCC CRL-10686 | Miller et al. 1991 |
| RD114 | FLYRD | HT-1080 人 | *bsr*, *ble* | 作者 | Cosset et al. 1995 |

在构建包裹细胞中所用的标记基因，包括疱疹单一病毒胸苷激酶基因（*tk*）、一个突变的耐甲氨蝶呤二氢叶酸还原酶基因（*dhfr**）、黄嘌呤乌嘌呤磷酸核糖转移酶基因（*gpt*）、潮霉素磷酸转移酶基因（*hpt*）、博罗霉素-*N*-乙酰基转移酶基因（*pac*）、灭菌素 S 基因（*bsr*）和耐药的博罗霉素、福来霉素基因（*ble*）。这些基因作为标记基因，主要是因为在已经被标记的包裹细胞中，运送一个特殊的选择性的标记载体不能被完成。

## 方案 1

# 瞬时转染产生载体

本操作指导是描述怎样通过瞬时转染来产生病毒载体。反转录病毒载体的生成需要一份能被包装进入病毒体的全长载体 RNA，这可通过表达质粒共表达载体 RNA 和病毒体形成所需蛋白质来完成。为了避免生成增殖型病毒，病毒的基因要由单独的质粒携带。总的来说，*gag* 和 *pol* 基因在一个质粒，病毒 *env* 基因在另一个质粒。用不同的启动子来表达病毒的蛋白质编码基因这样可以减少同源性从而减少重组。因为这些质粒没有 Psi（ψ）序列，所以病毒基因不可能被包装进入病毒体。

## 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

$CaCl_2$（2.0mol/L）＜！＞

D-10 培养基：DMEM 培养基加 10% 胎牛血清（DMEM-10），2mmol/L L-谷氨酸盐，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素＜！＞

HEK 293T 细胞（ATCC，CRL-11268）

HEPES 缓冲液（HBS）：混合 100μl 的 500mmol/L HEPES-NaOH（pH 7.1），125μl 的 2.0mol/L NaCl，10μl 的 150mmol/L $Na_2HPO_4$-$NaH_2PO_4$（pH 7.0），加 $H_2O$ 到 1ml。新鲜配置备用

磷酸缓冲液（PBS）

质粒

含有病毒 *gag*、*pol* 和 *env* 基因的包装质粒

载体质粒

制备提取无内毒素质粒（如用 QIAGEN 无内毒素纯化试剂盒）和决定质粒 DNA 的含量。

设备

生物安全柜

$CO_2$ 培养箱

无菌枪头

注射过滤器（0.45μm 孔径）

组织培养离心机

组织培养瓶（$75cm^2$）

## 方法

1. 准备 HEK 293T 单细胞悬液以 $5\times10^6$ 密度接种在 $75cm^2$ 的组织培养瓶，过夜培养。
2. 取出培养瓶弃掉培养基，加入 12ml 新鲜的 D-10 培养基继续培养。
3. 所有试剂使用前均需用 0.22μm 孔径无菌滤膜过滤。用水稀释质粒到总体积 876μl，加 124μl 的 2.0mol/L $CaCl_2$，轻轻混匀，再将这 DNA 悬液（1ml）滴加到 1ml 的 HBS 中，云絮样溶液形成，室温放置 30min，轻轻混匀，将 1.5ml 的 DNA/HBS 悬液加到培养瓶中，孵育过夜。
4. 弃掉培养瓶中的培养基，加 5ml PBS 冲洗后，加 12ml 新鲜培养基到培养瓶中继续培养 20～24h。
5. 从培养瓶中取出包含载体的培养基，用 0.45μm 过滤器过滤去除残留细胞，根据需要分装，储存在－70℃。

## 方案 2

# 生成稳定的载体产生细胞

这个程序是介绍怎样生成能够提供大量没有重组的反转录病毒载体的细胞克隆。过程（图 3）包括转染一个包装细胞系产生一种载体，再用来转入第二个包装细胞系。最终得到的生成载体的克隆一般会包括一个单一完整的反转录病毒载体拷贝。从这个完整拷贝产生的病毒会尽可能同源。可以和瞬时转染（方案 1）或产生非重组和重组混合载

体基因组的稳定转染进行比较（Bender et al. 1988；Miller et al. 1988；Lynch et al. 1993）。鼠和人源的适合的包装细胞系已经显示在表 2 和表 3 中。表中显示了亲嗜性载体不能转入人类细胞而长臂猿白血病病毒（GALV）和 RD114 载体不能转入鼠细胞。虽然有时一个包装细胞系产生的载体可以用来转染这个包装细胞系，但是转染效率非常低，因为包装细胞的受体已经被病毒的 Env 蛋白结合。实际上，这个程序也会对靶细胞进行选择，要求表达低水平的 Env 蛋白这样就不会对转染有太多的限制，但同时因为没有太多的 Env 蛋白产生，相应的载体的产率也会下降。因此要得到最高的载体浓度用一对包装细胞就显得十分重要，这样的话受体被结合就不是问题了。在这个例子里我们用 PE501 亲嗜性包装细胞来转染，然后用 PT67 包装细胞来做稳定的载体产生细胞，大体的策略见图 3。

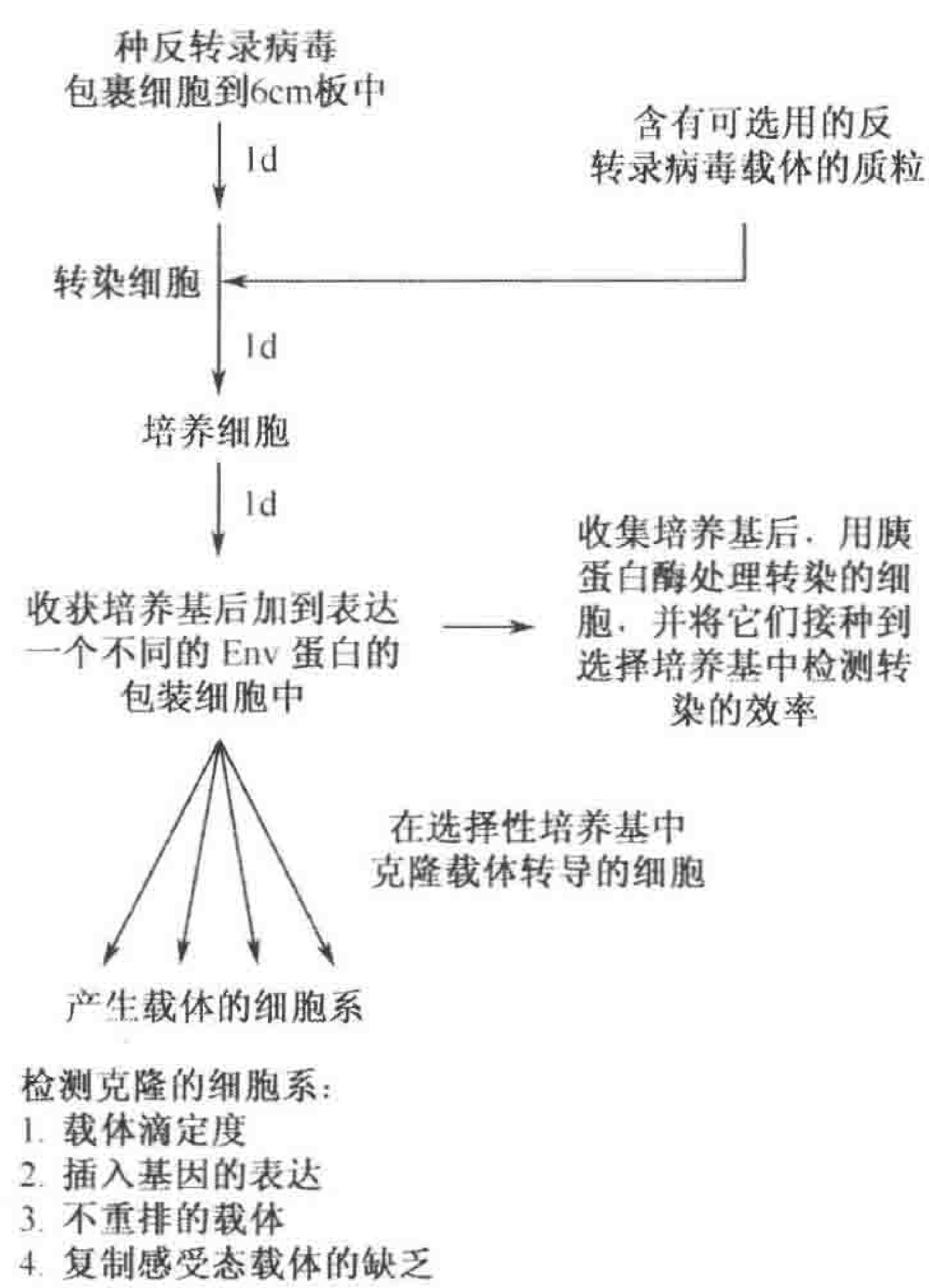



图 3. 反转录病毒的包装细胞系的构建。

**表 2. 小鼠包装细胞系对其他细胞系产生的载体转导的易感性**

| 产生载体的包装细胞 | 病毒受体 | 靶向鼠包装细胞的易感性 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ecotropic | 双嗜性 | 10A1 | GALV | RD114 |
| Ecotropic | CAT-1 | − | + | + | + | + |
| 双嗜性 | Pit2 | + | − | − | + | + |
| 10A1 | Pit1 和 Pit2 | + | + | − | + | + |
| GALV | Pit1 | − | − | − | − | − |
| RD114 | RDR | − | − | − | − | − |

**表 3. 人包装细胞系对其他细胞系产生的载体转导的易感性**

| 产生载体的包裹细胞 | 病毒受体 | 靶向人包裹细胞的易感性 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ecotropic | 双嗜性 | 10A1 | GALV | RD114 |
| Ecotropic | CAT-1 | − | − | − | − | − |
| 双嗜性 | Pit2 | + | − | − | + | + |
| 10A1 | Pit1 和 Pit2 | + | + | − | + | + |
| GALV | Pit1 | + | + | − | − | + |
| RD114 | RDR | + | + | + | + | − |

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

## 试剂

$CaCl_2$（2.0mol/L）<!>

D-10 培养基：DMEM 加 10% 胎牛血清（DMEM-10）

G418 <!> 根据包装细胞适合的标记来选择 histidinol 或 hygromycin B <!>（见表 2 和表 3）

Polybrene in PBS（4mg/ml；1000×），过滤除菌（Sigma-Aldrich）

沉淀缓冲液

混合 100μl 的 500mmol/L HEPES-NaOH（pH 7.1）、125μl 的 2.0mol/L NaCl，10μl 的 150mmol/L $Na_2HPO_4$-$NaH_2PO_4$ <!>（pH 7.0），加水至总体积 1ml，新鲜配置备用。

受体细胞（如 NIH-3T3 或 HeLa）

Tris-Cl（10mmol/L，pH 7.5）<!>

Trypsin-EDTA

载体质粒（必须带有选择标记）

包括一个仅携带选择性标记基因没有目的 cDNA 片段插入的载体作为阳性对照指示转染各步是否成功完成，再使用不携带反转录病毒载体的质粒作为阴性对照。

准备去内毒素质粒母液（如用 QIAGEN 无内毒素纯化试剂盒）和决定质粒 DNA 的含量。

## 设备

生物安全柜

$CO_2$ 培养箱

克隆环

felt-tip 笔

无菌滤膜（0.22μm）

有盖玻璃培养皿（10cm）

无菌枪头

硅树脂（或替代物）

组织培养皿（6cm 和 10cm）

离心管（12cm×75cm Falcon2054 或替代物）

镊子

## 方法

1. 第一天：以 $5\times10^5$ 细胞密度接种 PE501 包装细胞于 6cm 培养皿中培养过夜。
2. 第二天：用 4ml 新鲜培养基给 PE501 换液，用磷酸钙程序载体质粒 DNA 转染细胞，方法如下。

所有试剂使用之前均用 0.22μm 无菌滤膜过滤除菌。

a. 对于每一个质粒样品准备一个 DNA-$CaCl_2$ 溶液，按下面的方法混合。

25μl　　2.0mol/L $CaCl_2$

10μg　载体 DNA（在 10mmol/L Tris-Cl pH 7.5 溶液中）

加水到 200μl

b. 准备新鲜沉淀缓冲液。用一个干净的 12mm×75mm 多聚乙烯管，滴加 200μl DNA-$CaCl_2$ 溶液到 200μl 沉淀缓冲液中不断摇晃离心管。

混合溶液很快呈淡暗色，如果溶液澄清或者有大块沉淀都是错误的。

c. 室温放置 30min，把混合好的缓冲液放入细胞培养皿中，摇晃培养皿使缓冲液分布均匀，孵育过夜。

3. 第 3 天：将转染完的 PE501 细胞弃去培养基，加 4ml 新鲜培养基。以 $10^5$ 细胞密度接种 PT67 包装细胞于 6cm 培养皿，为每一个将转染完的 PE501 细胞准备两个平皿。培养过夜。
4. 用包含 4μg/ml Polybrene 的培养基给 PT67 换液，从每个转染完的 PE501 细胞的平皿内取出 3ml 包含病毒的培养基（留 1ml 培养基在用胰酶前不要让细胞干掉），将取出的培养基 3000*g* 离心 5min 以去除细胞和碎片。对每一个转染过的 PE501 细胞的平皿，取 1ml 包含病毒的培养基感染一盘 PT67 细胞，用 10μl 感染另一盘 PT67 细胞，然后把 PT67 细胞放回培养箱。
5. 胰蛋白酶作用后，以 1∶20 稀释接种 PE501 细胞于 6cm 培养皿，培养基含有 0.75mg/ml G418（激活浓度）、4mmol/L 组胺醇或者 0.4mg/ml 的均霉素 B，这依载体中选择性标记而定。把细胞重新放回培养箱。
6. 第 5 天：胰蛋白酶作用感染 PT67 细胞，以 9∶10 和 1∶10 稀释后接种细胞于 10cm 培养皿。培养皿中有 10ml 培养基和选择的药物。

   用 1ml 或者 10μl 病毒感染以 9∶10 和 1∶10 稀释的 PT67 细胞导致一个 4 对数排列的稀释液，这为分离克隆细胞株产生合适的克隆量。

7. 第 9 天：染色 PE501 细胞，评估 5d 后克隆的形成情况作为衡量 DNA 转染的效率。每毫克质粒 DNA 转染大约 1000 个克隆是非常有代表性的。
8. 第 9～14 天：传代转染 5～10d 的 PT67 细胞，直到耐药克隆形成并且能被看见为止。
9. 从有少数量的克隆板中使用克隆环分离克隆。

   a. 准备使用的克隆环：在 10cm Petri 板的下部铺一层薄的硅树脂，在板中放入环以至树脂覆盖边缘末端，高压灭菌。

   b. 分离克隆，放置克隆，用 felt-tip 笔在每个克隆板上画个圆圈。

   举板子在灯光下非常容易看到克隆，但要小心不要洒出培养基。我们发现在空气层流装置中关掉气流对于避免放置的克隆环干燥非常有用。

   c. 吸出培养基，放克隆环在克隆集落的上面，用镊子按下。

10. 每个容器中加入一滴含 EDTA 的胰酶，观察胰酶的消化情况。
11. 当细胞已经聚集，向每个环中加入培养基（一对一），把培养基用力吸入吸量管以移去细胞。

    我们典型的分离大约 10 个克隆用来分析。

12. 扩增后，用 Southern 法分析一个完整载体结构的克隆带、高的载体滴度、存在辅助病毒（见下一页标志物分析）和插入基因的表达。

## 病毒的收集和分析

1. 准备病毒，更换培养基以产生载体细胞的汇合培养物代替。12～24h 后收集培养基于 3000 *g* 离心 5min 培养液以移除细胞和残余碎片。

   用同一板细胞可以每隔 12h 重复 3～4 次。包含培养基的病毒能立即用来感染受体细胞。冻存在－70℃以备将来使用。

2. 测定载体滴度

   a. 以 $5\times10^5$ 个/6cm 板的细胞密度接种受体细胞（如 NIH-3T3 或者 HeLa）过夜生长。

   b. 用包含 4μg/ml 的 1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物的培养基换液。加各种比例稀释的实验病毒。过夜培养。

   c. 胰酶消化细胞，并用含 0.75mg/ml G418（激活浓度）培养基 1∶20 的比例稀释以便于载体运送 *neo* 基因，用 4mmol/L 的组胺醇以运送 *hisD* 基因，用 0.4mg/ml 的潮霉素 B 以运送 *hph* 基因。根据细胞株调节浓度，继续培养。

   d. 5～7d 后，染色、计数克隆。计算病毒滴度。

## 辅助病毒的标志物分析

此分析检测了那些来自于包含一个载体但不是产生一个载体的细胞中的病毒样本反转录载体的能力。检测一个给定的辅助病毒的能力分析依赖于辅助病毒是否能感染细胞。例如，ecotropic 辅助病毒不能通过人的细胞来检测。因此我们必须选择和辅助病毒相匹配的细胞来用（参考文献 22）。该分析稍微有点慢而且有点繁琐。但是，它非常的敏感，而且是本文反转录病毒设计和诱导载体能力中最重要的特征性检测方法。在这里步骤 8 以下是可供选择的。

1. 为了使细胞包含一个载体而不是释放载体，用传送选择性的标记物（我们使用运送 *neo* 基因的 LN 载体）的无辅助性的载体来感染 NIH-3T3 或者 HeLa 细胞，为存在的基因（对于 *neo* 的 G418）选择细胞。

   该病毒能从产生高滴度载体的细胞株中获得。

2. 两周内，传代细胞以使潜在的辅助病毒（不应该是现有的）扩散。分别使用 NIH-3T3 细胞分析细胞载体的产生，用 HeLa 细胞分析病毒的产生。
3. 保存不能产生载体的细胞用来标记补救分析（步骤 4 叙述的方法）。
4. 接种在步骤 3 中鉴定过的包含 *neo* 载体的非生产细胞（NIH-3T3 或者 HeLa 细胞）于 $5\times10^5$ 个/6cm 的培养板中，生长过夜。
5. 加 1ml 的实验病毒（3000 *g* 离心 5min 除去细胞和碎片），3ml 规律的培养基，4μg/ml的 1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物感染非产生细胞。有少量的双向辅助病毒质粒［如用 pAM-MLV（Miller and Buttimore 1986）转染的 NIH-3T3 细胞产生 1μl 或更少的病毒。两周内传代，使细胞完全被感染］作为感染阳性对照。其他的辅助病毒在非生产细胞中能复制。
6. 两周内传代细胞使辅助病毒扩散（为了取得临床材料的资格时间可调为 3 周，见 Wilson et al. 1997）。小心操作不要交叉污染培养物，其中的一些开始时以非常高的滴度感染复制病毒，一周内胰酶消化细胞 2～3 次。用 1∶10～1∶40 的比例稀释液

重新接种细胞，使细胞有相对高的密度以使病毒容易扩散。

7. 传代非生产细胞 13d 或者 20d 后（见步骤 20），以 $10^5$ 个/6cm 板的密度接种首次用于实验的 NIH-3T3 或者 HeLa 细胞（和使用的非生产细胞一样的细胞类型）于培养板中。生长过夜。
8. 从非生产细胞中收回培养基，在 4μg/ml 的 Polybrene 存在下用 1ml 的样本感染用于初次试验的 NIH-3T3 或者 HeLa 细胞。3000*g* 离心 5min 培养基以除去细胞和碎片。一些耐药的活细胞能随着培养基转运以致显示一个假阳性的结果。放新的感染细胞回培养箱。生长过夜。
9. 用含有 G418（对于 NIH-3T3 细胞 0.75mg/ml 的激活浓度，对于 HeLa 细胞 1.0mg/ml 的激活浓度）的培养基给新感染的细胞换液。
10. 5d 后，染色，计数克隆数。

    克隆集落的存在说明了在实验样本中，辅助病毒补救了 *neo* 载体。通常，这是非常明显的，阳性板上面覆盖了一层耐药克隆集落。

## 补充 $S^+/L^-$ 分析

一个可选择性的标记补救分析方法是 $S^+/L^-$ 分析（Reeves et al. 2002）。在该分析中，除了不包含载体的扩增细胞外，病毒和补救标记一样被扩增。参考 $S^+/L^-$ 使用目的，细胞株检测病毒可以用来代替。例如，含鼠肉瘤病毒（MSV）基因组（$S^+$）但缺少 MLV 基因组（$L^-$）的猫细胞株 PG-4。表达 MSV 的细胞诱导一个显性的转变，但 MLV 需要共同表达。假如收集的来自于扩增细胞包含复制结构的反转录病毒，PG-4 细胞将被转化，并且在 PG-4 细胞培养物中的重点被检测。$S^+/L^-$ 分析在非扩增期也同样适用。这对于检测具有复制结构的反转录病毒滴度非常有用。在标记补救分析中，扩增细胞株和目的细胞的选择依赖于载体的假模标本（Wilson et al. 1997；Chen et al. 2003）。

## 方案 3

# 细胞株的转导

该方案适合许多贴壁细胞株的转导。通过维持表面积和体积的比率以及使用大小不同的容器，被转导的细胞能按照需要的变化而变化。使用载体对细胞的比率，这个方案对于非贴壁的细胞也是适用的。

## 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞培养基（能使细胞转导的正常生长培养基）

鱼精蛋白硫酸盐或者 Polybrene

反转录病毒载体材料
实验用细胞

设备

生物安全柜
$CO_2$ 培养箱
无菌枪头
水浴，预先设定在 37℃
组织培养离心机
组织培养瓶

## 方法

1. 准备实验细胞单细胞悬液并计数每毫升细胞数。为转导组和模拟转导对照组准备培养物。假如转导总体选择的药物参与其中，准备一个次级的模拟转导对照组以作为评价药物潜力的选择对照。对于贴壁细胞，在每个 $75cm^2$ 组织培养容器中，12ml 适当的培养基中含 $5\times10^2$ 个细胞，在 37℃，5% $CO_2$ 培养箱中培养过夜。
2. 在 37℃水浴中迅速解冻载体并准备稀释液。从细胞暴露到解冻的时间应尽可能的短。
3. 吸出并弃去细胞中的培养基。
4. 按下面的方法转导。
   a. 载体转导：在每个 $75cm^2$ 容器中加入 4ml 含有培养基的载体，培养基含 10μg/ml 鱼精蛋白硫酸盐或者 8μg/ml 的 Polybrene。
   b. 模拟转导：向适当的对照培养物中加入 4ml 含 10μg/ml 鱼精蛋白硫酸盐或者 4μg/ml 的 Polybrene 的新鲜培养基。

   加入多聚阳离子如精蛋白硫酸盐或者 Polybrene 是为了增强带阴离子电荷的细胞和载体粒子之间的相互作用，结果能使转导效率增加 10 倍以上。1000×的多聚阳离子溶液配置是非常方便的。多聚阳离子对于原代细胞和某些细胞株，假如这样，可以测试一个有最小毒性但最佳基因转染的合适使用剂量。

   c. 把细胞放回 37℃，5% $CO_2$ 培养箱中。向载体暴露细胞 4h。

   对于细胞株，一般来说，多于 4h 并不能明显增强细胞的转染效率。为了增强基因的转染，优先选择在连续数天内重复转染的方法，前提是细胞已经进入转染周期。

   d. 培养后，吸去容器中的培养基，加入新鲜的培养基然后放到培养箱中继续培养。
5. 最佳的细胞选择或者细胞分类：经常产生的载体伴随着转导总体增强的标记基因表现出特殊的转基因力。如果进行了选择，转导后加入选择的标记药物 24～48h。对照组包括含有药物或者没有药物的模拟转导培养物。假如分子表达在表面或者荧光蛋白被表达，载体表达细胞就很容易被分类，大多数的转导细胞载体的表达需要等 72h 以保证有充足的时间。
6. 大多数细胞株大约转导 72h 后能看到整合的转基因的稳定表达。在接下来的使用中，细胞能用来分析或者扩增。

## 疑难解答

问题（步骤 4）：基因转染效率低。

解决方法：考虑三个因素：感染的多样性（moi）、载体滴度和转导时细胞的密度。每个细胞株最佳的 moi 是不一样的。对大多数无穷繁殖的细胞株，每个细胞 10～20 感染载体粒子是足够的，尤其是转导细胞的选择在计划中。原代细胞通常需要高的 moi（如果可能的话）、共区域化（如下面描写的）或者转导的多重循环。尽管每个细胞的整合数量能增长，但转导效率趋向于平台区。载体滴度（或者浓度）也是一个因素，一般来讲，浓度越大基因转染的水平越高（接近于平台区）。

# 方案 4

# 原始造血细胞的转导

该方案叙述了原始造血细胞的转导。没有周期性变化的细胞与反转录病毒载体是相关耐药的。对于大多数的细胞株活跃的无穷繁殖不是一个问题。然而，对于原代细胞，尤其是对于处于静止期的祖细胞和干细胞，细胞的转染率特别低。在血液祖细胞中，有两个介入因素与细胞结合可使基因转染效率增大：第一，使用细胞因子或者别的生长因子刺激造血祖细胞的细胞周期（Bodine et al. 1989，1991；Nolta and Kohn 1990；Luskey et al. 1992)；第二，应用像纤维连接蛋白等基质蛋白（Moritz et al. 1994)，这类蛋白介导目的细胞（通过 VLA-4-和 VLA-5-键合位点）和载体（通过肝素键合位点）的共区域化。效率最高的是和重组体结合，这样可以使目的细胞和载体封闭性的接近。

## 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞生长培养基（完全的和无血清的）

Iscove's modified Dulbecco's medium（IMDM）含 10%的胎牛血清（FBS)、1%谷氨酰胺、20μg/ml 的庆大霉素或者含 1%人血清白蛋白和 20μg/ml 的庆大霉素X-Vivo培养基（Cambrex）

细胞分离缓冲液（Invitrogen）

细胞

对于小鼠祖干细胞，5-氟尿嘧啶处理的小鼠收集骨髓细胞或者使用 VarioMACS（Miltenyi Biotec）浓集阴性细胞。对于人祖干细胞，用 VarioMACS（Miltenyi Biotec）的方法从骨髓、外周血中分离。用荧光激活细胞分类术浓集多数原代造血细胞（鼠-$Lin^{neg}$ $c\text{-}Kit^{+}$，$Sca\text{-}1^{+}$；人 $CD34^{+}$ $CD38^{-}$）

细胞因子鸡尾酒（通常用来刺激细胞）

Flt3-配基-血小板生成素（TPO）+干细胞因子（SCF）（每份 100ng/ml）
粒细胞克隆刺激因子（G-CSF）+Flt3 配基+TPO+SCF（每份 50～100ng/ml）
G-CSF+TPO+SCF（每份 100ng/ml）
白细胞介素-6（IL-6）（100U/ml）+SCF（每份 100ng/ml）

磷酸盐缓冲液（PBS）

Retronectin

Retronectin 可以作为低压冻干粉使用或者在预涂布的 35mm 板（Takara，www.takaramirusbio.com 或者 Cambrex，www.cambrex.com）上使用。用无内毒素的蒸馏无菌水准备 Retronectin 材料（1mg/ml）。

反转录病毒载体材料

设备

离心机
荧光激活细胞分类仪器（FACS）
显微镜
Petri 皿或者多孔板
一次性的塑料制品（处理非组织培养：BD Biosciences）
聚丙烯管
VarioMACS（Miltenyi Biotec）用来强化大多数的原代造血细胞

## 方法

1. 在转导前 12～48h，接种每毫升 $2\times10^5$～$4\times10^5$ 个的细胞用来转导（培养基含有细胞因子）。用一个实验性的方法测定预刺激期的长度和转导细胞周期的数量（Hanenberg et al. 1997）。
2. 在转导的当天，按照下面的方法用 Retronectin 涂布平板。
   a. 在聚丙烯管中用 PBS 稀释 Retronectin，然后，以 $2\sim5\mu g/cm^2$ 涂布无组织培养的平板（见下表涂布 $2\mu g/cm^2$）。例如，涂布 24 孔板，加 $4\mu l$ 的 Retronectin 到 0.5ml 的 PBS 使每个孔都被覆盖。吸吹混匀后加入孔中。

   使用无组织培养的培养板是因为它的表面的疏水性能促使 Retronectin 键合得最佳。

   板的大小和 Retronectin 的覆盖浓度：

| 板的类型 | 工作表面积/$cm^2$ | Retronectin 在 $2\mu g/cm^2$/($\mu g$/孔) | Retronectin/($\mu g$/孔) | PBS/(ml/孔) |
|---|---|---|---|---|
| 96 孔板 | 0.3 | (1.0) | 1.0 | 0.1 |
| 24 孔板 | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 0.5 |
| 12 孔板 | 3.3 | 7.0 | 7.0 | 1.0 |
| 6 孔板 | 9.6 | 19 | 19 | 2.0 |
| 10cm 板 | 58.1 | 116 | 116 | 5.0 |

   b. 在室温下培养 2h 或者包在塑料包裹中 4℃培养过夜。

c. 使用前，吸出 Retronectin/PBS 溶液。

3. 测定细胞转导的大概数量。用 Retronectin 在 $1.0\times10^5\sim2.0\times10^5$ 个/$cm^2$ 的密度转导（见下表）。

每 Retronectin 覆盖孔或者板中的细胞数。

| 板的类型 | 工作表面积/$cm^2$ | 细胞数/孔/($10^5$个/$cm^2$) | 反转录载体和培养基/(ml/孔) |
|---|---|---|---|
| 96 孔板 | 0.3 | $3.2\times10^4$ | 0.2 |
| 24 孔板 | 2.0 | $2.0\times10^5$ | 1.5 |
| 12 孔板 | 3.3 | $3.3\times10^5$ | 3.0 |
| 6 孔板 | 9.6 | $9.6\times10^5$ | 5.0 |
| 10cm 板 | 58.1 | $5.8\times10^6$ | 10.0 |

该方案对于贴壁细胞和非贴壁细胞株的基因转染都适合。对于贴壁细胞来说，或许在开始转导时每孔需要比上表显示的更少的细胞。这可以用经典实验方法来测定。

4. 接下来预刺激，收集、计数细胞。培养基和反转录病毒载体上清的比例是 1∶1，并用细胞因子鸡尾酒补充。

5. 4h 后，收集没有贴壁的细胞，离心。加含细胞因子的新鲜培养基，再离心，放回没有贴壁的细胞后培养箱中培养过夜。每个转导循环都需要这样做。

在连续数天内，细胞转导 2～3 个循环，只要细胞不是太密集保持细胞在同一块 Retronectin 板上。如果细胞变得密集，收集后换一块新的 Retronectin 板。

6. 最后的转导循环完成后，培养过夜。

7. 重悬细胞后放入管中，把 PBS（每 10cm 板用 5ml；6 孔板中的每孔用 3ml）洗每个板的洗液倒进管中。加分离缓冲液（和 PBS 一样的体积）后放在通风橱中 2～3min。轻拍板的边缘，收集残余的细胞直至显微镜下观察没有细胞残余。

## 疑难解答

问题（步骤 4）：长期移植物移入被调节。

解决方法：这可能是因为造血细胞和含上清的反转录病毒的接触促使这些细胞分化。对于所有的上清这是不正确的，因此应该根据经验测定。关于 Retronectin，Spinoculation 能被用来重新负荷病毒粒子，因此使细胞远离有潜在伤害影响的反转录病毒上清。对于 Spinoculation，加反转录病毒上清到 Retronectin 覆盖的孔中，在 22℃，2000*g* 离心 2h。据报道，24 孔板中的 1 个孔吸附病毒粒子时需要的最佳反转录上清体积是 1.0ml（Tonks et al. 2005）。在该方案中，细胞培养在含有细胞因子的新鲜培养基中。2000*g* 离心 5min 将使细胞更容易吸附在 Retronectin 覆盖的皿上。

问题（步骤 7）：不适当的长期移植物移入。

解决方法：在连续的转导中使细胞恢复 2d 可以增强造血细胞的长期移植物移入（Takatoku et al. 2001）。在该过程中，细胞保持在 Retronectin 覆盖的皿上。在接

下来的转导中，收集没有贴壁的细胞离心。除去老的培养基，加入含干细胞因子（100ng/ml）的新鲜的培养基。再离心，加回没有贴壁的细胞（Takatoku et al. 2001）。

## 参考文献


Bender M.A., Miller A.D., and Gelinas R.E. 1988. Expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into murine erythroleukemia cells and human BFU-E cells. *Mol. Cell. Biol.* **8:** 1725–1735.

Berns A. 2004. Good news for gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **350:** 1679–1680.

Bodine D.M., Karlsson S., and Nienhuis A.W. 1989. Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86:** 8897–8901.

Bodine D.M., McDonagh K.T., Seidel N.E., and Nienhuis A.W. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: Effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol.* **19:** 206–212.

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L., and Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288:** 669–672.

Challita P.M. and Kohn D.B. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 2567–2571.

Chen J., Reeves L., and Cornetta K. 2001. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **12:** 61–70.

Cornetta K. 1992. Safety aspects of gene therapy. *Br. J. Haematol.* **80:** 421–426.

Cornetta K., Nguyen N., Morgan R.A., Muenchau D.D., Hartley J.W., Blaese R.M., and Anderson W.F. 1993. Infection of human cells with murine amphotropic replication-competent retroviruses. *Hum. Gene Ther.* **4:** 579–588.

Cosset F.L., Takeuchi Y., Battini J.L., Weiss R.A., and Collins M.K. 1995. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* **69:** 7430–7436.

Dave U.P., Jenkins N.A., and Copeland N.G. 2004. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* **303:** 333.

Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D., McDonagh K., Dunbar C., Goodman S., Agricola B., Byrne E., Raffeld M., Moen R., et al. 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176:** 1125–1135.

Duffy L., Koop S., Fyffe J., and Cornetta K. 2003. Extended $S^+/L^-$ assay for detecting replication competent retroviruses pseudotyped with the RD114 viral envelope. *Preclinica* **1:** 53–59.

Forestell S.P., Dando J.S., Chen J., de Vries P., Bohnlein E., and Rigg R.J. 1997. Novel retroviral packaging cell lines: Complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Ther.* **4:** 600–610.

Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay J.P., Thrasher A.J., Wulffraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., et al. 2002. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **346:** 1185–1193.

Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., Le Deist F., Wulffraat N., McIntyre E., Radford I., Villeval J.L., Fraser C.C., Cavazzana-Calvo M., and Fischer A. 2003a. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348:** 255–256.

Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., et al. 2003b. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302:** 415–419.

Hanenberg H., Hashino K., Konishi H., Hock R.A., Kato I., and Williams D.A. 1997. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2193–2206.

Hanenberg H., Xiao X.L., Dilloo D., Hashino K., Kato I., and Williams D.A. 1996. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* **2:** 876–882.

Hawley R.G. 2001. Progress toward vector design for hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr Gene Ther* **1:** 1–17.

Jahner D., Stuhlmann H., Stewart C.L., Harbers K., Lohler J., Simon I., and Jaenisch R. 1982. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298:** 623–628.

Kaleko M., Garcia J.V., Osborne W.R., and Miller A.D. 1990. Expression of human adenosine deaminase in mice after transplantation of genetically-modified bone marrow. *Blood* **75:** 1733–1741.

Kraunus J., Schaumann D.H., Meyer J., Modlich U., Fehse B., Brandenburg G., von Laer D., Klump H., Schambach A., Bohne J., and Baum C. 2004. Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Ther.* **11:** 1568–1578.

Li Z., Dullmann J., Schiedlmeier B., Schmidt M., von Kalle C., Meyer J., Forster M., Stocking C., Wahlers A., Frank O., Ostertag W., Kuhlcke K., Eckert H.G., Fehse B., and Baum C. 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296:** 497.

Luskey B.D., Rosenblatt M., Zsebo K., and Williams D.A. 1992. Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* **80:** 396–402.

Lynch C.M., Israel D.I., Kaufman R.J., and Miller A.D. 1993. Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Hum. Gene Ther.* **4:** 259–272.

Mann R., Mulligan R.C., and Baltimore D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33:** 153–159.

Markowitz D., Goff S., and Bank A. 1988. A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62:** 1120–1124.

Miller A.D. and Buttimore C. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* **6:** 2895–2902.

Miller A.D. and Chen F. 1996. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* **70:** 5564–5571.

Miller A.D. and Rosman G.J. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7:** 980–990.

Miller A.D., Bender M.A., Harris E.A., Kaleko M., and Gelinas R.E. 1988. Design of retrovirus vectors for transfer and expression of the human beta-globin gene. *J. Virol.* **62:** 4337–4345.

Miller A.D., Garcia J.V., von Suhr N., Lynch C.M., Wilson C., and Eiden M.V. 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **65:** 2220–2224.

Moritz T., Patel V.P., and Williams D.A. 1994. Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J. Clin. Invest.* **93:** 1451–1457.

Nolta J.A. and Kohn D.B. 1990. Comparison of the effects of growth factors on retroviral vector-mediated gene transfer and the proliferative status of human hematopoietic pro-

genitor cells. *Hum. Gene Ther.* **1:** 257–268.
Overbaugh J., Miller A.D., and Eiden M.V. 2001. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycosylphosphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65:** 371–389.
Pannell D. and Ellis J. 2001. Silencing of gene expression: Implications for design of retrovirus vectors. *Rev Med Virol* **11:** 205–217.
Reeves L., Duffy L., Koop S., Fyffe J., and Cornetta K. 2002. Detection of ecotropic replication-competent retroviruses: Comparison of s(+)/l(−) and marker rescue assays. *Hum. Gene Ther.* **13:** 1783–1790.
Takatoku M., Sellers S., Agricola B.A., Metzger M.E., Kato I., Donahue R.E., and Dunbar C.E. 2001. Avoidance of stimulation improves engraftment of cultured and retrovirally transduced hematopoietic cells in primates. *J. Clin. Invest.* **108:** 447–455.
Tonks A., Tonks A.J., Pearn L., Mohamad Z., Burnett A.K., and Darley R.L. 2005. Optimized retroviral transduction protocol which preserves the primitive subpopulation of human hematopoietic cells. *Biotechnol. Prog.* **21:** 953–958.
Watanabe S. and Temin H.M. 1983. Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Mol. Cell. Biol.* **3:** 2241–2249.
Wilson C.A., Ng T.H., and Miller A.E. 1997. Evaluation of recommendations for replication-competent retrovirus testing associated with use of retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **8:** 869–874.

# 第三章　研发表达 siRNA 的慢病毒载体

Gustavo Tiscornia, Oded Singer 和 Inder M. Verma
The Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, La Jolla, California 92037
赵建明　译



## 摘要

本章描述了如何使用慢病毒载体传递小干扰 RNA（siRNA）介导的沉默盒。这两种技术的结合发展成为体内外长期降低特定靶标基因表达的强大工具。它结合了 RNA 干扰的特异性和慢病毒载体的多功能性，可以转染多种类型的细胞。

## 引言

RNA 干扰是新近发展起来的调节基因表达的一种方法。关于其通路的研究很多，相关的基础生物学机制在很多地方都有描述（Denli and Hannon 2003）。简单地说，内切核酸酶 Dicer 将长双链 RNA 分子处理成 21～23nt 的 siRNA，然后结合形成 RNA 诱导沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC），多元件的核酸酶复合体，可以选择性地降解与外源导入的双链 RNA 同源的 mRNA（Fjose et al. 2001；Hannon 2002）。在哺乳动物系统中，siRNA 可以通过外源性地导入或内源性的聚合酶 III 启动表达，对靶 mRNA 产生持续而特异性的降解（Elbashir et al. 2001；Brummelkamp et al. 2002；Miyagishi and Taira 2002；Oliveira and Goodell 2003）。深入探究这项技术，需要发展有效的 siRNA 传递方法。在本章中，我们讲述了用慢病毒载体表达 siRNA，特异地沉默靶标基因的实验设计和制备。

### 慢病毒载体概述

在过去的十年中，以 I 型人类免疫缺陷病毒（HIV-1）（慢病毒的典型代表）为基

础的基因传递载体得到了很好的发展。从 HIV-1 中获得的慢病毒载体可以转染很多种分裂和非分裂细胞，稳定地整合到宿主基因组中，使转基因得以长期表达。HIV-1 基因组包括 9 个可读框（ORF），编码至少 15 种在感染周期中涉及的蛋白质，包括结构蛋白和调节蛋白。另外在病毒生活周期的不同阶段还需要很多的顺式作用元件（Trono 2002）。一般制作载体病毒颗粒的策略是将 HIV-1 基因组中的所有可省去的基因删去，把顺式作用序列与那些反式作用因子分开，因为后者在病毒颗粒产生、感染和整合中起着重要的作用。

普遍使用的第三代慢病毒载体包括四个质粒（图 1A）。转移载体中包含要转移到慢病毒骨架（包括在基因组 RNA 产生和组装中需要的所有的顺式作用序列）中的转基因。组装系统包括 3 个额外的质粒（pMDL、pRev 和 pEnv），它们可以提供所需的反式作用因子，即 Gag-Pol、Rev 和一个包装蛋白。它们分别编码整合酶、反向转录酶和结构蛋白。病毒颗粒的产生需要结构蛋白、整合酶和反向转录酶分子包装进病毒颗粒，它们在后继的感染中是必需的。Rev 与 Rev 反应元件（Rev-responsive element，RRE）可以相互作用。RRE 是包含在转移载体中的一段序列，可以加强细胞核输出未剪切的病毒基因组 RNA，增加病毒的滴度。

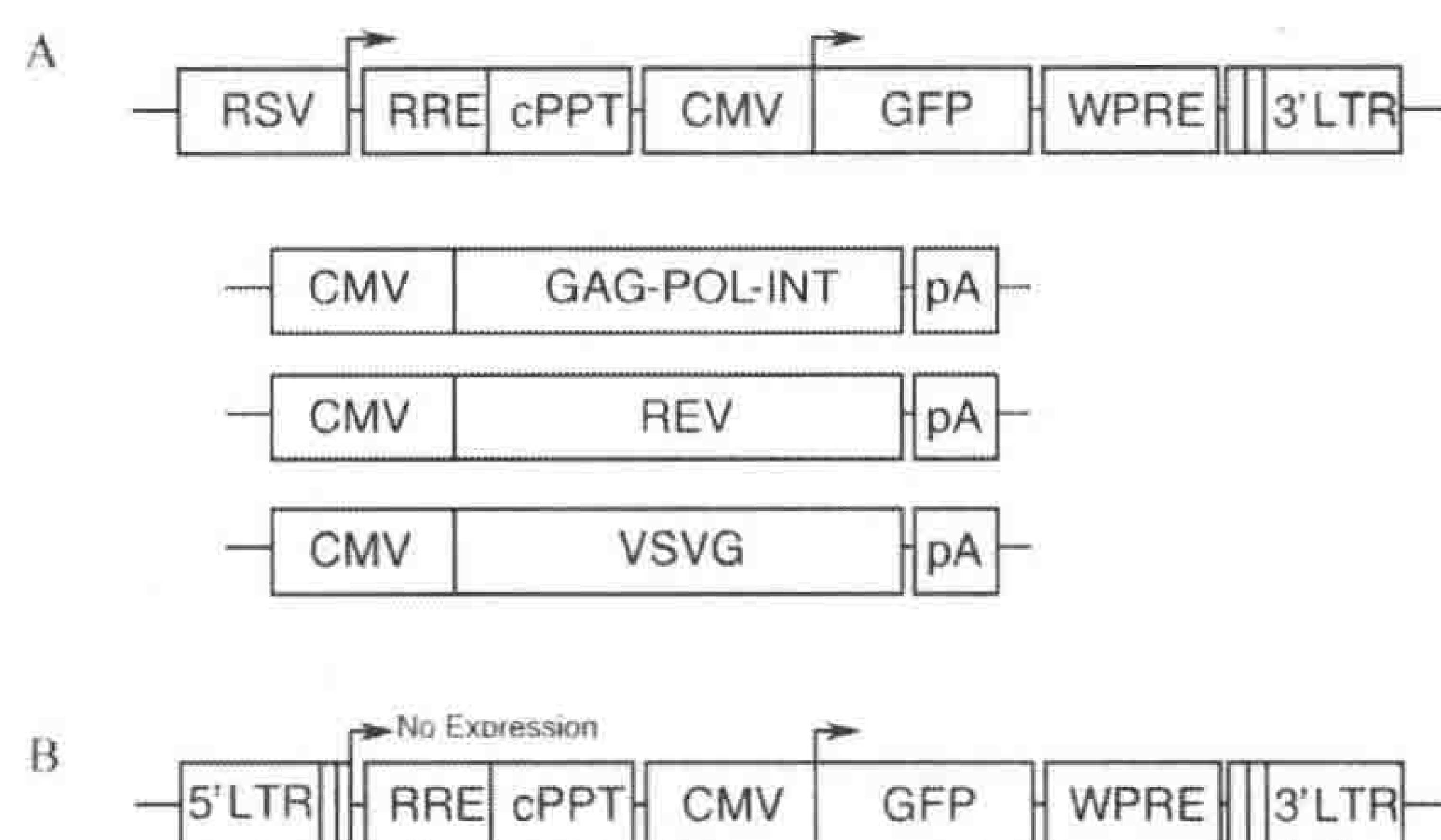



图 1. A. 第三代慢病毒载体系统。转移载体包括转移载体 RNA 复制组装入病毒颗粒所需的所有顺式作用原件。装载能力约 8kb。带阴影线的框表示自失活删除。3 个协助质粒提供所有必需的反式作用因子（文中有详细介绍）。B. 整合前病毒的结构。

可以使用很多种不同的包装蛋白形成假型病毒颗粒。水泡性口炎病毒 G 蛋白（VSV-G）就是一种常用的包装蛋白，它结合到病毒膜中，使得病毒可以转化很多种类型的细胞，包括原代细胞、干细胞和早期胚胎细胞。转移载体还包括土拨鼠嗜肝病毒调节原件（WPRE）用以加强转基因的表达（Zufferey et al. 1999）和一个中心多聚嘌呤管道（cPPT）用以增加向细胞核输入前整合复合体的效率（Zennou et al. 2000）。另外，一个重要的安全性特征就是将 3′LTR（长末端重复序列）删除导致病毒颗粒复制缺陷。在反向转录中，前病毒 5′LTR 从 3′LTR 复制过来，这样导致了 5′LTR 的删除。删除了 5′LTR 就丧失了转录活性，阻止了从整合前病毒产生病毒基因组 RNA（图 1B）（Miyoshi et al. 1998）。当将这四种质粒转染 293T 人类胚胎肾细胞后，病毒颗粒在上清中累积，通过超速离心可以得到高滴度的病毒。

## 慢病毒载体表达 shRNA 的设计

关于 siRNA 的一个重要突破就是可以通过克隆 pol III 启动子到质粒上将 siRNA 表

达为小发夹 RNA（shRNA）（Brummelkamp et al. 2002；Miyagishi and Taira 2002）。最长用到的两个 pol III 启动子是 H1 和 U6（人和小鼠）。pol III 启动子非常小（小于 400bp）（Myslinski et al. 2001），启动子功能所需序列都在 +1 转录起始位点的上游。pol III 启动子可以普遍有效地表达小 RNA（shRNA），所以很适合表达 shRNA，载体中包括与要下调的 mRNA 靶标序列相同的 21～23nt 的正义序列，然后是一个 9bp 的环和一个反义 21～23nt 序列。连续 5 个胸腺嘧啶提供 pol III 转录终止信号。沉默盒的全长大概有 350bp。当构建物表达的时候，一个 21～23bp 的发夹结构就形成了；环状结构会被 Dicer 消化掉，进而产生 siRNA 诱导的靶标 mRNA 降解。

理论上，一个沉默慢病毒载体需要包括一个标记基因如 EGFP（加强型绿色荧光蛋白，enhanced green fluorescent protein）或一个抗生素抗性基因和 shRNA 沉默盒。我们设计了两种不同版本的慢病毒沉默载体，它们在沉默盒位置和构建的策略上都有所不同。

版本 A（方案 1）中，慢病毒载体使用 GFP 作为标记，将人类 H1 驱动的沉默盒克隆到 3′LTR 的一个唯一限制位点上（Tiscornia et al. 2003）。在整合的过程中，前病毒的 5′LTR 是从 3′LTR 中复制过来的，于是将 H1 驱动的沉默盒克隆入 3′LTR 就造成了沉默盒的重复。尽管这种方式使得慢病毒载体的沉默能力最大化，但是从我们的经验来看，决定沉默水平的最主要的参数是感染复数（multiplicity of infection，moi）。沉默一个靶标所需的感染复数取决于靶标 mRNA 的表达水平、siRNA 效率和所用细胞类型的可转导性。

在版本 A 的设计中要避免 siRNA 靶标序列在标记基因的 mRNA 中也存在，这将导致标记基因的低表达。在版本 B 慢病毒载体中，沉默盒的位置在标记表达盒的上游，避免了对标记基因表达的下调。因为沉默盒不在 3′LTR 中，每个病毒颗粒中只有一个沉默盒的副本。这种设计方法作为另一种有效的克隆方法已被入门克隆技术所采用（方案 2）。

## 设计和克隆慢病毒沉默载体

开发并鉴定一种有效的慢病毒沉默载体包括以下几步：①选择 siRNA 靶标序列，设计 shRNA；②克隆并鉴定 shRNA 对靶标基因的作用；③克隆检验慢病毒沉默载体。特定 siRNA 的效力大部分是不可预测的，推测起来可能是因为受到 RNAi 通路和对靶标 mRNA 三级结构的可接近性两个方面的限制。有很多算法用来预测有效的 siRNA 序列（Reynolds et al. 2004），很多都可以在线获得免费的和商业的（如 www.ambion.com 或 http://sfold.wadsworth.org）。靶标序列长度一般是 21～23 个碱基，但是长度到 28 个碱基的也有报道（Paddison et al. 2002）。应该避免过长，因为更长的双链 RNA 分子会激发 PKR（双链 RNA 激活蛋白激酶，protein kinase activated by double-stranded RNA）应答（Clemens and Elia 1997）。需要进行数据库搜索过滤掉在其他基因中也有出现的候选靶标，避免沉默其他基因。GC 含量应该为 40%～55%。由 H1 启动子驱动的 shRNA 可以以任何一个碱基起始，但是 U6 启动子要求以 G 作为 shRNA 的第一个碱基。shRNA 可以是靶标 mRNA 的 5′非翻译区（5′UTR）、ORF 或 3′UTR。不能出现某些特定碱基。对于环状结构，一般采用 9bp 序列（TTC AAG AGA）（Brum-

melkamp et al. 2002)。

一般对于一种靶标基因应该设计几种 shRNA 并进行测试。将这些候选的 shRNA 克隆到仅含有沉默盒的简单质粒中进行检测。然后将有效的沉默盒转入慢病毒载体。初始的筛选可以通过将一个 shRNA 表达质粒和一个携带靶标 cDNA 的载体共转染到 293T 中，然后针对靶标做免疫印迹（Western blot）。如果候选质粒可以有效地转染入所用的细胞中，还可以使用定量反转录酶链反应（quantitative RT-PCR）、Northern 杂交或者通过免疫印迹分析靶标蛋白的水平来推断靶标沉默效率。

如果一个或多个候选 shRNA 被证实是有效的，沉默盒必须克隆到慢病毒载体中。制备高滴度病毒预备液，转染表达靶标蛋白的细胞系，然后检测靶标表达量。最后对慢病毒沉默载体沉默内源靶标的检测是非常重要的，而且还要加入没有沉默盒的慢病毒载体或携带针对不同靶标的沉默盒的慢病毒载体作为对照。因为任何一种 siRNA 的过表达都会引起一些非特异性的基因表达沉默。还应该检测不同的感染复数。对沉默效率的精确测定需要得到完全被转染的细胞群。对于标记 GFP 的可以通过荧光激活细胞分选（FACS）来筛选 GFP 阳性细胞，对于标记抗生素抗性基因的可以使用抗生素分选。

## 方案 1

## 设计和克隆一个 shRNA 到慢病毒沉默载体中：版本 A

本指南描述一种针对靶标设计和克隆 shRNA 的方法。我们使用一个包含 pol III 启动子的质粒作为模板，经过一轮 PCR 扩增沉默盒。使用一个位于 pol III 启动子上游的 5′引物和一个包含所有 shRNA 序列（正义序列、环状结构序列、反义序列、最后有 5 个连续的 T）和 22 个与 pol III 启动子+1 转录起始位点上游的 22bp 互补的碱基序列的反向 3′引物。正向和反向引物的 5′端都包含一个相同的 *Nhe*I 酶切位点（如 *Xba*I）。PCR 扩增产生包括 shRNA 表达框的 DNA 片段可以克隆到简单克隆载体中进行检测，然后转移到慢病毒载体中，或者直接克隆到慢病毒载体中（图 2）。

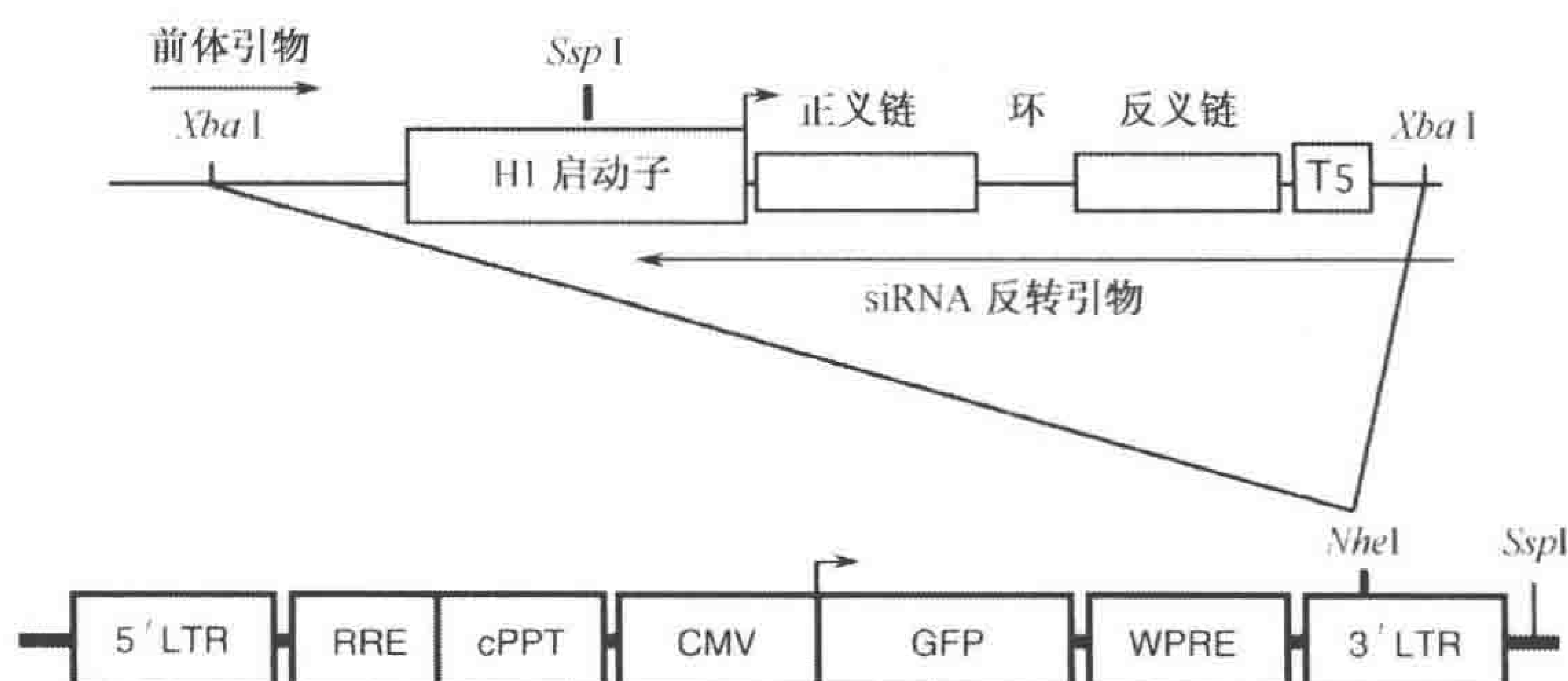



图 2. 版本 A 克隆图解（正文中有详细介绍）。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

## 试剂

Advantage GC-2 聚合酶混合液（BD）

2×BES 缓冲血清（BBS）溶液（50mmol/L BES，280mmol/L NaCl，1.5mmol/L $Na_2HPO_4$ <!>）

混合 16.36g NaCl、10.65g BES（Calbiochem 391334）和 0.21g $Na_2HPO_4$。添加双蒸水至 900ml。溶解，用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 6.95，添加双蒸水至终体积 1L。过滤除菌，16ml 分装后保存于 4℃。

$CaCl_2$（2.5mol/L）储备液<!>

细胞：293T 人类胚胎肾细胞（Invitrogen）

二甲亚砜（dimethylsulfoxide）（DMSO；7%）<!>

DMEM 培养基

ELISA 试剂盒，p24（New England Nuclear Life Science product NEK050B）（可选：见步骤 15）

胎牛血清（FBS）

Hank 平衡盐溶液（HBSS；Invitrogen）

克隆到 pGEM-T 中的 H1 启动子（Promega）

质粒

pMDL（Gag-Pol）

pREV

pVSV-G

对于质粒制备，使用 1μg/μl 的 QIAGEN plasmid maxipreps。

多聚赖氨酸（poly-L-lysine）（Sigma-Aldrich P 4832）

溶于 PBS，终浓度 0.001%。过滤除菌保存于−20℃。

限制性内切核酸酶：*Nhe*I、*Ssp*I、*Xba*I

蔗糖（20%溶于 HBSS）

## 设备

Beckman 管（358126 和 326819）

过滤器（0.22μm 或 0.45μm）

培养箱，预设 37℃（3%和 10% $CO_2$）

离心管

PCR 仪

Sw58 和 Sw55 离心机（Beckman）

细胞培养皿（15cm，6 孔板）

## 方法

### shRNA 的设计和克隆

1. 在基因中选择一段靶标序列来沉默，如对于 GFP：GCAAGCTGACCCTGAAGTTC

(Tiscornia et al. 2003)。

2. 设计引物扩增沉默盒。使用有 H1 启动子克隆的 pGEM-T 为模板。5′正向引物必须包含 *Xba*I 位点。3′反向引物包括 pol III 启动子 3′端的 22 个核苷酸和一个包括全部 shRNA 序列、环序列和转录终止信号（T5）的 5′尾巴和 *Xba*I 位点的序列。对于上面提到的靶标来说，3′反向引物可以这样设计：5′CTGTCTAGACAAAAAG-CAAGCTGACCCTGAAGTTC**TCTCTTGAA**GAACTTCAGGGTCAGCTTGc***GGG-GATCTGTGGTCTCATACA***3′（斜体为 H1 序列，画线部分为 *Xba*I，黑体画线为环状序列，小写 c 表示+1 核苷酸）。
3. 使用如上所述的 5′正向和 3′反向引物（最终引物浓度为 10μmol/L），10ng 包含 H1 启动子的质粒为模板，PCR 扩增沉默盒。我们使用 advantage GC-2 聚合酶混合物，并使用 10×的 GC-melt 佐剂，另外非常重要的还要加入 7% DMSO 或者相似的试剂来调节 *Taq* 聚合酶反应阻止发夹结构的形成。扩增的参数设置如下：

| 循环次数 | 变性 | 复性 | 延伸 |
|---|---|---|---|
| 第一轮 | 3min,94℃ | | |
| 30 轮 | 30s,94℃ | 30s,55℃ | 40s,72℃ |
| 最后一轮 | | | 10min,72℃ |

4. PCR 的结果就是扩增出大约 400bp 的片段，可以连接到 A/T 载体中进行测序或者直接克隆到慢病毒质粒中。*Xba*I 消化插入片段，琼脂糖凝胶电泳纯化。*Nhe*I 消化慢病毒质粒，电泳纯化，然后去磷酸化。

   一般 50ng 载体连接 100ng 插入片段，转化感受态细菌。可以通过 *Ssp*I 酶切筛选连接转化成功的菌落，原载体只含有一个 *Ssp*I 位点，而插入目的片段的载体会获得另外一个 *Ssp*I 位点（位于 H1 启动子）。使用 H1-F 引物 5′-TGGCAGGAAGATGGCTGTGA-3′并测序来确认发夹结构也是非常重要的。因为发夹序列中的突变会显著降低基因沉默的效率。

5. 通过转染或转导（慢病毒颗粒）到表达靶标基因的细胞来鉴定克隆的 shRNA 沉默盒。另外还可以在易于转染的细胞系（如 293T）中加入与 shRNA 沉默盒共表达的靶基因 cDNA。

   当靶标 mRNA 只在特定细胞中存在或没有靶标的特异性抗体时，这种方法特别有用。一般，我们在每个孔中（6 孔板）加入 200ng 靶标 cDNA 和 500～1000ng 包含沉默盒的质粒进行转染。转染后 48～72h 收集细胞进行免疫印迹分析。

## 慢病毒载体制备

6. 准备 12cm×15cm 平皿慢病毒：转染前 24h，准备平皿和细胞。
   a. 10ml 聚赖氨酸附着 12cm×15cm 平皿，室温培养 15min，吸除液体，以增加细胞黏着力。
   b. 立即从两个细胞汇合的 15cm 平皿中接种细胞到 12cm×15cm 平皿（DMEM+10%FBS）。加入 1%抗生素 抗菌素溶液不影响转染。细胞传代次数不宜过多，超过 20 次的就不要用了，否则生长很慢。某些品牌的 FBS 不支持有效转染，会引起病毒滴度过低。

c. 细胞过夜培养。

7. 在转染时，细胞应该达到70%～80%的汇合度并均匀分布确保其滴度。使用 $CaPO_4$ 方法将质粒混合液转化入细胞：
   a. 分别将四种质粒加入到 50ml 管中。对于一个 12cm×15cm 平皿，加入：
      270μg 慢病毒载体
      176μg pMDL（Gag-Pol）
      95μg pVSV-G
      68μg pREV
   b. 准备 $CaCl_2$ 工作液（13.5ml 0.25mol/L $CaCl_2$）加入质粒混合液。加入 13.5ml 2×BBS 液。颠倒混匀，室温孵育 15min。
   c. 加入转染混合液（滴状分布）（2.25ml/平皿）。轻轻晃动平皿 37℃，3% $CO_2$ 孵育过夜。
8. 转染 16～17h 后，移除培养基。每个培养皿中加入 15ml 新鲜的 DMEM＋2%FBS，37℃、3% $CO_2$ 过夜培养。
9. 培养皿中收集上清，0.22～0.45μm 过滤器过滤。每个培养皿中加入 15ml 新鲜培养基，培养过夜。

   过滤的上清可以在 4℃下储存数日。

10. 收集培养基如上步一样过滤。
11. 将步骤 9、10 得到的上清合在一起。转移入 Beckman 管（358126），每管 25～29ml。SW28 rotor 中 20℃，19 400r/min 离心 2h，浓缩病毒颗粒。
12. 所有沉淀用 1ml HBSS 重悬。再用 1ml HBSS 清洗所有的管。
13. 合并的 HBSS 中继续加入 HBSS 至 3ml，在 Beckman 管（326819）中加入 1.5ml 20%蔗糖溶液分层。SW55 rotor 中 20℃，21 000r/min 离心 1.5h。
14. 沉淀在 100μl HBSS 中重悬，再用 100μl HBSS 清洗管子，合并。低速振荡器中振荡重悬的病毒预备液 15～30min。离心 10s 除去碎片。病毒液分装－80℃储存。可以储存数月。避免反复冻融。
15. 利用 p24 ELISA 试剂盒量化衣壳蛋白 p24 来进行病毒预备液定量，或者通过加入到慢病毒载体中的标记来进行生物学定量。

    滴度正常范围为 $10^9$～$10^{10}$ 个/ml，但是如果组装质粒的转染效率不理想的话，滴度可能降低。

## 方案 2

# 设计和克隆一个 shRNA 到慢病毒沉默载体中：版本 B

本指南描述了构建慢病毒载体沉默系统的另一种方法。本方法已经被作为克隆技术入门（Invitrogen），可以迅速快捷地完成克隆过程（图 3）。首先，将一个 shRNA 克隆到载体（pENTR/U6，Invitrogen）hU6 启动子的下游。沉默盒两侧为 λ 噬菌体中的两个重组位点（*attL1* 和 *attL2*）。一旦得到一个有效的 shRNA 就可以将其转入目的载体。目的载体是一个带有标记（GFP 或一个筛选标记）的慢病毒载体，在标记的上游是目

的片段（两侧为 *attR1* 和 *attR2*，中间为一个 *ccdB* 毒性基因）。因此沉默盒可以通过一个简单的 LR 克隆反应从进入载体转入到目的载体中。

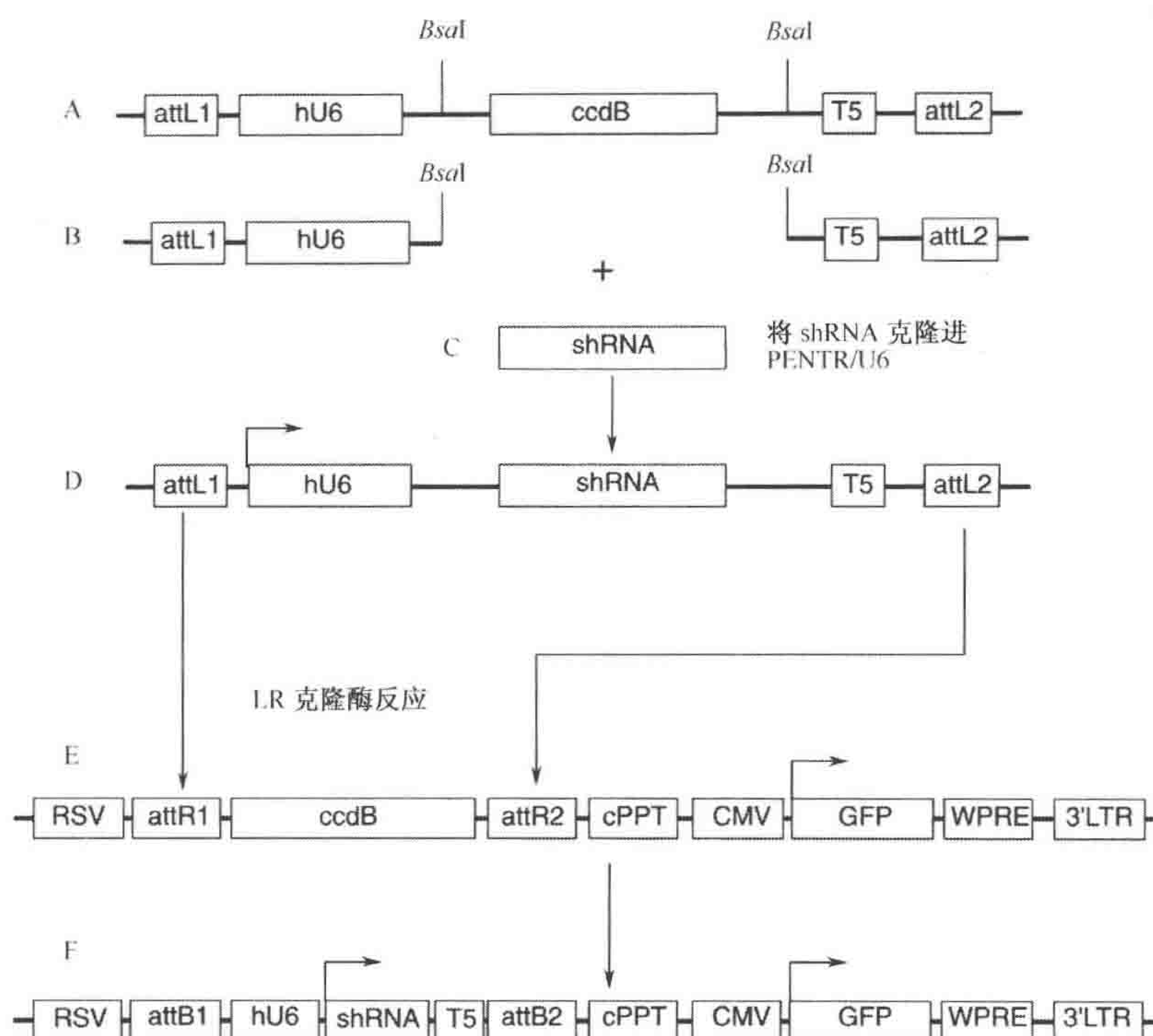



图 3. 版本 B 的克隆图解。A. PENTR/U6 结构；B. *Bsa*I 消化后产生可插入 shRNA（C）片段的末端，连接获得沉默盒（D）。然后，λ 噬菌体 *att* 重组位点允许将沉默盒转移到慢病毒终末载体（E）中。最终获得包含沉默盒和 GFP 标记的慢病毒重组载体（F）。

## 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖凝胶（4%）

10×复性缓冲液

　100mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）<！>

　10mmol/L EDTA

　1mol/L NaCl

*E. coli* DB3.1（Invitrogen）

卡那霉素（kanamycin）<！>和氨苄青霉素（ampicillin）<！>平皿

5×LR 缓冲液（Invitrogen）

寡聚核苷酸；浓度大约 200μmol/L

pENTR/U6（Invitrogen）

蛋白酶 K<!>

限制性内切核酸酶：*Ava*I、*Bsa*I、*Cla*I、*Nde*I、*Xba*I

STBL3（Invitrogen 或相似的重组缺陷菌株）

设备

PCR 仪

## 方法

1. 在基因中选择一段靶标序列来沉默，如对于 GFP：GCAAGCTGACCCTGAAGTTC（Tiscornia et al. 2003）。
2. 设计一个 shRNA 并将其克隆到 pENTR/U6 中。图 3a 为 pENTR/U6 图示。更为详细的图示可以从 Invitrogen 网站上下载到。pENTR/U6 有一个 *ccdB* 毒性基因，必须在有抗性的菌株如 *E. coli* DB3.1 中扩增。用 *Bsa*I 对这种质粒切割后产生如下片段：

   XXXXX　3′　　　　5′TTTTTXXXXXXX

   XXXXXGTGG 5′　　3′　　　AXXXXXXX

   为了克隆 shRNA，设计两个与 pENTR/U6 酶切片段互补的寡聚核苷酸，然后复性，连接（图 3b、c、d）。对于上述的 GFP 靶序列，复性后，所需的寡核苷酸序列如下：

   5′CACC　*GCAAGCTGACCCTGAAGTTC*　**TTCAAGAGA**……

   　　3′ *CGTTCGACTGGGACTTCAAG*　**AAGTTCTCT**……

   ……GAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3′

   ……CTTGAAGTCCCAGTCGAACG　AAAA 5′

   其中发夹序列的正义链用斜体标记，黑体为环序列，发夹序列的反义链有下画线。
3. 复性并按以下步骤克隆：
   a. 制备复性混合液

   5μl P1（终浓度 50μmol/L）

   5μl P2（终浓度 50μmol/L）

   2μl 10×复性缓冲液

   8μl $H_2O$

   b. 加热到 94℃，5min。使用 PCR 仪，以 0.1℃/s 的速率降温到 25℃。

   甚至在终浓度为 50μmol/L 时，反应效率也只有 50%。复性效率可以用复性寡聚核苷酸（5μl 100 倍稀释复性混合物）于 4%琼脂糖凝胶电泳来确定。单链寡聚核苷酸以发夹结构形式电泳后位于大约 30bp 长的部位，而复性产物的大小应位于 55bp 左右。

   c. 用水稀释复性混合物 1000 倍，将它们克隆到 pENTR/U6 载体。一般，50ng 载体与 2～3μl 1000 倍稀释的复性产物连接。转化感受态细菌并在卡那霉素培养皿中筛选，最终得到的质粒结构见图 3d。

d. 用 *Nde*I-*Xba*I 酶切菌落中得到的质粒 DNA，继而跑 4%琼脂糖凝胶电泳。阳性克隆会包含一段大约 127bp 的插入片段，没有插入片段的菌落质粒为 76bp。hU6-F（GGACTATCATATGCTTACCG）和 M13-R 引物扩增测序，检查发夹序列的完整性。

4. 沉默盒的检验可参照方案 1 中的步骤 5。找到一个合适的候选 shRNA 之后就可以通过一个 LR 重组反应将沉默盒从进入载体转入到终末载体中。图 3e 为典型终末载体图示。

a. LR 重组反应，加入：

100～300ng 进入载体

150ng 终末载体

4μl 5×LR 缓冲液

加水至终体积 20μl

b. 室温孵育过夜。

c. 加入 2μl 蛋白酶 K，37℃孵育 10min。

d. 2μl LR 反应混合物转化 STBL3 感受态细菌（或类似的重组缺陷菌株），氨苄青霉素平皿中培养。

最终构建物的结构见图 3f。使用重组缺陷型细菌可以进行高效重组，因为使用其他菌株质粒会发生不需要的重组事件。

e. 用 *Cla*I-*Ava*I 酶切质粒 DNA。包含沉默盒的克隆应该有一个大约 700bp 的插入片段，非重组原终末载体有一个 1.9kb 的插入片段。用 hU6-F（5′-GGA CTA TCA TAT GCT TAC CG-3′）测序阳性克隆。

5. 至于载体的准备，可参阅方案 1 中的步骤 6～15。

## 参 考 文 献


Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296:** 550–553.

Clemens M.J. and Elia A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: Structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* **17:** 503–524.

Denli A.M. and Hannon G.J. 2003. RNAi: An ever-growing puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **28:** 196–201.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411:** 494–498.

Fjose A., Ellingsen S., Wargelius A., and Seo H.C. 2001. RNA interference: Mechanisms and applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **7:** 31–57.

Hannon G.J. 2002. RNA interference. *Nature* **418:** 244–251.

Miyagishi M. and Taira K. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3′ overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **20:** 497–500.

Miyoshi H., Blomer U., Takahashi M., Gage F.H., and Verma I.M. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* **72:** 8150–8157.

Myslinski E., Ame J.C., Krol A., and Carbon P. 2001. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.* **29:** 2502–2509.

Oliveira D.M. and Goodell M.A. 2003. Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences. *Genesis* **36:** 203–208.

Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., and Conklin D.S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16:** 948–958.

Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., and Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22:** 326–330.

Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., and Verma I.M. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1844–1848.

Trono D. 2002. *Lentiviral vectors.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L., and Charneau P. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101:** 173–185.

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., and Hope T.J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73:** 2886–2892.

# 第四章　用于人基因治疗的 HIV-2 载体：设计、构建和治疗前景

Kevin V. Morris[*] 和 Flossie Wong-Staal[†]

[*] Division of Rheumatology, Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037; [†] Immusol, Inc., San Diego, California 92121

张洪杰　译



## 摘要

反转录病毒家族中的慢病毒亚家族是一种独特的病毒，因为它能够稳定感染分裂细胞和非分裂细胞。除此之外，它们倾向于整合到基因编码区。基于这些原因，它们提供了一套非常有效的能转染任何靶细胞的基因转运载体系统。事实上，我们已经取得了许多关于慢病毒载体系统的进展和试验，包括人免疫缺陷病毒系统（HIV-1 和 HIV-2）、猴免疫缺陷病毒系统（SIV）以及猫免疫缺陷病毒系统（FIV）。慢病毒载体可以被设计成复制不完全或者是复制条件依赖型（可运动型）载体。HIV-2 载体在抗 HIV 的基因治疗中更加有效，是因为它比相应的 HIV-1 载体的致病能力弱，而且在感染细胞中不易与 HIV-1 重组。本章讨论 HIV-2 载体的设计、应用以及它作为载体在转运有关基因的试验，特别是在抗 HIV 基因治疗方面的情况。

## 引言

### 慢病毒生物学基础（HIV-1、HIV-2、SIV 和 FIV）

慢病毒是一种非癌基因的反转录病毒，能够引起许多与免疫和炎症疾病相关的持续感染。HIV-1 和 HIV-2 能够特异地使免疫调节细胞衰竭（$CD4^+$ 和巨噬细胞）。HIV-1 是全世界获得性免疫缺失综合征（AIDS）的最主要的治病因素（Barre-Sinoussi et al.

1983；Gallo et al. 1984）。AIDS是一种全球流行性疾病，其中约95%的感染患者居住在发展中国家（Temesgen 1999）。HIV-2是1986年在西非发现（Clavel et al. 1986a、b）的并被证实与在黑色白眉长尾猴体内发现的猴免疫缺陷病毒（SIVsm）有高度的同源性。SIVsm与HIV-2的相对近似的同源性支持了HIV-2是起源于SIVsm从黑色白眉长尾猴向人种间传递的假设（Gao et al. 1994）。尽管HIV-2也与AIDS相关，但是临床和体外试验数据表明HIV-2的致病能力要比HIV-1弱（Azevedo-Pereira et al. 2005）。

与所有的反转录病毒一样，慢病毒也是一种含有包膜的正链RNA病毒，这种病毒使用反转录酶将其RNA基因组转录成DNA前病毒。前病毒然后可以整合到细胞基因组中。慢病毒的RNA基因组相对较大（约10kb）。HIV-1的前病毒能编码大约15个蛋白质，包括所有反转录病毒都含有的三个编码区域：*gag*、*pol*和*env*。*gag*编码衣壳蛋白，*pol*编码病毒复制所必需的酶类（反转录酶、蛋白酶和整合酶），*env*编码那些病毒颗粒用于黏附到特异细胞受体所需要的外部糖蛋白（图1A）（Coffin 1998）。除此之外，HIV-1基因组还编码6个在病毒感染和复制过程中起到不同作用的其他基因（*tat*、*rev*、*vif*、*vpr*、*vpu*和*nef*）（图1A）。HIV-2基因组与HIV-1相似，不过HIV-2基因组含有*vpx*基因，而没有*vpu*基因（图1B）。不过，在体外只有*tat*和*rev*对病毒复制是必需的。HIV前病毒基因组的两端都有一个包含U3/R/U5序列的长末端重复序列（LTR）基序（图1C）。转录的单启动子位于U3区域，而AAUAAA多聚腺苷酸信号位于LTR的R区域内。病毒转录起始于5′端的U3/R连接处，而终止于3′端的R/U5连接处，因此使得病毒RNA基因组中R末端富余（图1C）。病毒蛋白质的产生是由一条单一的初级转录体通过一个复杂的机制来实现的，这个过程包括：①通过蛋白酶来产生和分解原始多蛋白前体（Pettir et al. 2003）；②核糖体框架的迁移来抑制转录终止；③初级转录体的可变剪切（Reinhart et al. 1996）或者是生成能够产生2种蛋白质的双顺反子mRNA（Coffin 1998）。

## 基因治疗中的反转录病毒载体

慢病毒的发现以及研究慢病毒所获得的相关知识，尤其是HIV-1，导致人们去使用这些病毒来发展那些具有独特特征的基因转运载体。慢病毒载体被设计成复制缺陷型，以将感兴趣的基因（如治疗基因）转移整合到靶细胞中去。它们能够稳定地将基因整合到分裂和非分裂细胞（Naldini et al. 1996）中去的能力使得它们显得格外有用。

慢病毒载体被广泛使用到各种试验模型中。例如，它们能够被用于转运小干扰RNA（siRNA）来使靶基因沉默、转运cDNA文库寻找功能基因，以及转运特殊的基因来生成转基因动物（见综述Wiznerowicz and Trono 2005）。慢病毒载体可以用于基因治疗的前期开发研究。尤其令人感兴趣的是可以用慢病毒载体（包括HIV-1、HIV-2/SIV和FIV）来把抗HIV-1的治疗基因转移到病毒感染的靶细胞中去（Buchschacher and Wong-Staal 2001；Mautino and Morgan 2002）。许多候选的载体系统被证明在体外有比较突出的抗HIV-1效率，而基于HIV-2的载体系统在治疗HIV-1感染的效果最为明显。它拥有许多HIV-1载体的优点，例如，它在体内能跟随野生型HIV-1而运动（D'Costa et al，2001），而且它能扩散到HIV-1病毒靶向的细胞中去；它也能

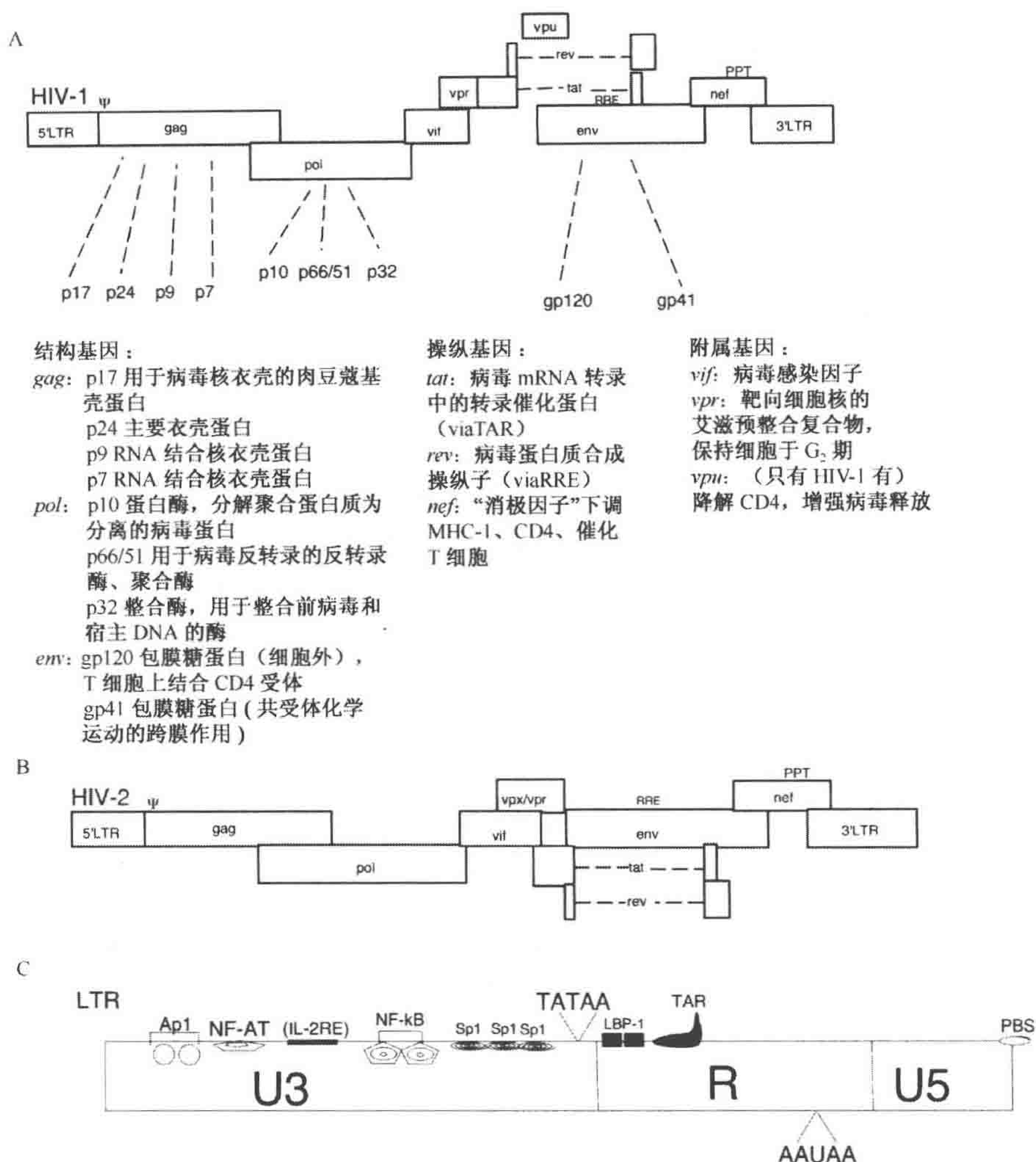



图 1. A. HIV-1 的基因组结构。虚线标记的几行描述了对产生 Tat 和 Rev 蛋白必需的拼接反应，以及附属蛋白和结构蛋白的遗传位置。结构基因及其各自的基因产物列于左边，操纵基因及其基因产物列于右边。多聚嘌呤（PPT）和 Rev 反应元件（RRE）位点都显示出来了。B. 破折号标记的 HIV-2 基因组结构显示了生产早期表达的 Tat 和 Rev 必需的拼接反应。C. HIV-2 的 LTR，转录因子结合位点，TATAA 框、Tat 活力区（TAR）、AAUAA 多聚腺嘌呤位点、tRNA 结合位点（PBS）都显示出来了。

和病毒蛋白质如 Gag（病毒包装所需蛋白）、Tat 和 Rev（病毒复制所需蛋白）竞争，增进 HIV-1 感染靶细胞的抗病毒效果。另外，基于 HIV-2 的病毒载体要比 HIV-1 载体更安全，因为 HIV-2 的致病性较低，而且由于它们全序列的不同，能够降低产生 HIV-1 重组子的可能性。

HIV-2 慢病毒载体系统基本上是由三个质粒系统组成的：HIV-2 载体、包装质粒和包膜表达质粒。包装质粒提供由 *gag* 编码的结构蛋白、由 *pol* 编码的复制酶和由 *tat*

和 *rev* 编码的一些必需的调节蛋白。而附属基因 *vif*、*vpx*、*vpr* 和 *nef* 通常没有被包含在载体系统中。这三种质粒被共转染到宿主细胞中，通常是 293 纤维母细胞，然后收集上清中的载体转导进所选的靶细胞中，就像图 2 中所描述的那样。更多详细的有关这三种质粒的结构的信息将在下文中阐述。

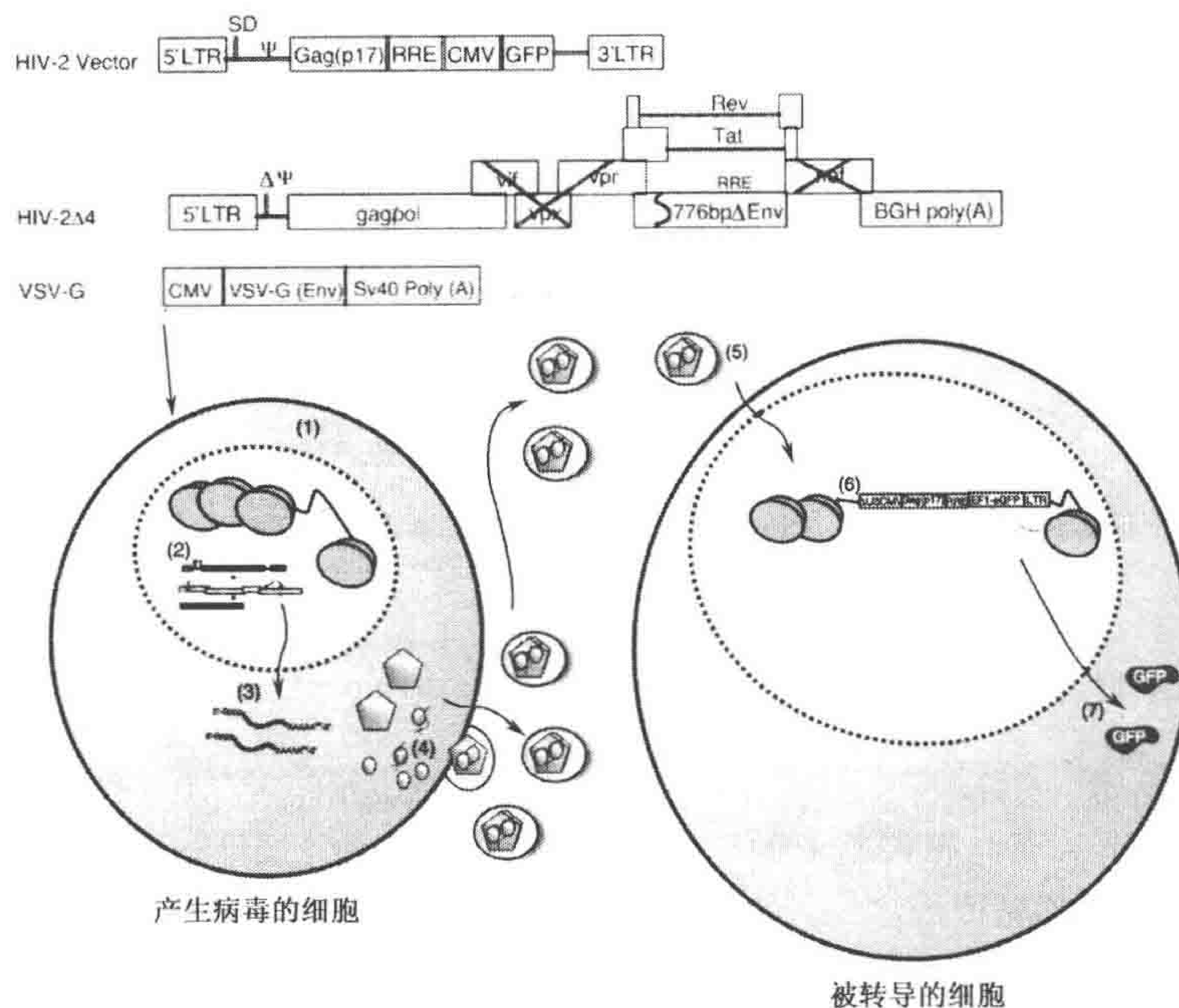



图 2. HIV-2 载体的生产。(1) HIV-2 载体的产生需要用包装质粒（HIV-2Δ4）、包膜质粒（VSV-G）和 HIV-2 载体共转染 293T 生产细胞；(2) 在核内编码病毒调控和结构蛋白的载体 RNA 和 mRNA 都能被转录；(3) 功能的 Tat 和 Rev 蛋白的表达可通过 LTR/启动子增强和转录，*gag-pol* 的载体 RNA 和 mRNA 可从核内转到细胞质中；(4) 所有的载体必需成分都得以表达；(5) 载体 RNA 被包裹进衣壳中；(6) 48～72h 后，收集培养液上清，通过度量靶细胞中 GFP 的表达 (7) 来测定载体的浓度。

## HIV-2 载体

一个有效的 HIV-2 载体必须能够产生一个 RNA，它可以被包装进感染颗粒，这些颗粒能够进行病毒的进入、反转录翻译、靶细胞中的前病毒整合以及整合后表达相关的转基因。为了满足这些要求，一个合适的 HIV-2 载体应该包含图 3 中所描述的和下文所详细讨论的一些关键特点。

## 载体和转基因启动子

基本的 HIV-2 载体包括两个 LTR。5′LTR 起到必要的作为 RNA 载体的启动子的功能（图 1C）。表达 LTR 需要 Tat 蛋白，它由包装质粒在宿主细胞中的瞬时表达提供（图 3）。因此，Tat 蛋白是在宿主细胞中表达而不是在靶转导细胞中表达，除非后者感

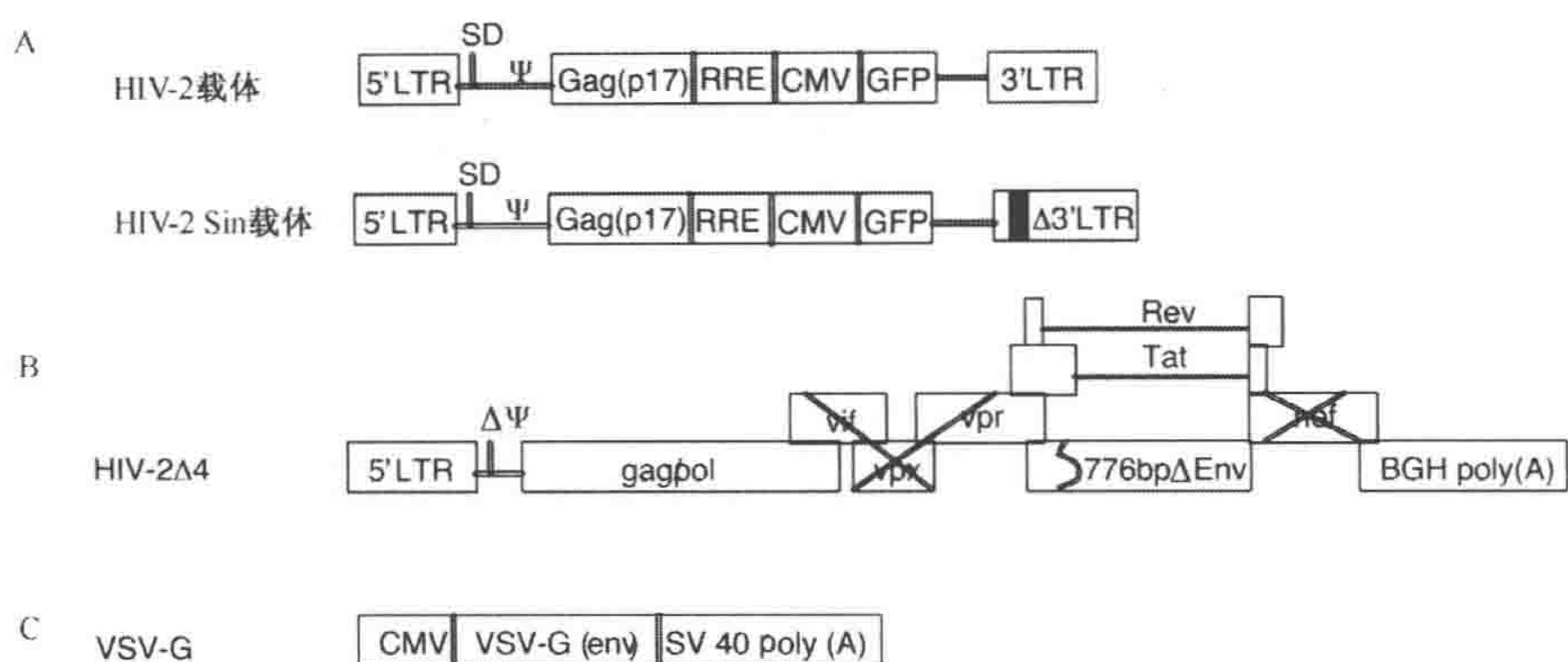



图 3. HIV-2 载体系统。A. HIV-2 载体能被设计成包含有功能性 3′LTR 或自我失活的（HIV-2Sin 载体），包含有 3′LTR 上 U3 缺失的转运子（HIV-2 载体）。图中给出了带有 CMV 启动子表达的 GFP 标记基因的载体。然而，可以用抗生素抗性或其他标记基因代替 GFP。抗病毒形态如 siRNA 或核酶能克隆进 CMV-GFP 标记基因的上游。B. 显示了包含缺失 *vif*、*vpr*、*vpx*、*nef* 和大约 776bp HIV-2 包膜的 HIV-2 装配质体。装配质体中 RRE 位点的出现确保了足够数量的装配 mRNA 从细胞核内转到细胞质内。C. VSV-G 包膜被用来促进细胞定向和取代 Δ776-bp HIV-2 包膜。

染了 HIV-1 病毒。有趣的是，HIV-2 的 LTR 中的 Tat 感应元件（TAR）能利用 HIV-1 的 Tat 来激活转录从而与靶细胞中的 HIV-1 TAR 竞争 Tat（见综述 Morris and Rossi 2004）。但是，既然基因治疗的目的是在细胞被感染前将抗病毒的基因转导入细胞中，因此，一个与 Tat 无关的内部启动子应该被用于驱动转基因的表达。这个启动子应该是一个强烈而且广泛表达的启动子如细胞巨化病毒（CMV）（图 3A）或者是一个具有细胞类型特异性的启动子。为了减少任何 HIV-2 片段在靶细胞中的表达，避免上游启动子干扰下游转录基因启动子，可以将 3′LTR 变异成自我不能活化（SIN）的载体。SIN 载体在 3′LTR 的 U3 区域包含一个启动子缺失的和增强子元件（图 1C 和图 3A）。RNA 载体在 3′LTR 的 U3 区域的缺失能够维持下去，在靶细胞反转录的时候它将复制到前病毒的两个 LTR 中去。整合的质粒 DNA 的 5′LTR 的 U3 区域的变异使得启动子的功能无法实现从而表达载体 RNA。SIN 载体提供了另一个安全保障，因为它们能够减少整合载体表达病毒序列在被 HIV-1 感染的细胞中被包装或者是重组成 HIV-1 病毒的可能性。仔细分析 SIN 载体揭示了可选择的缺失包括下游结合因子（DBF1）和 U3 中的 SP1 位点（图 1C 和图 3A）（Logan et al. 2004）。

## 引物结合序列和多嘌呤位点

载体序列的 LTR 和两端的临近序列对于反转录过程是必需的。从 U5 下游开始往 5′端方向的 18 个核苷酸序列组成了引物结合序列，而反转录酶被用于生成负链强终止 DNA。这个反应中的引物就是 tRNAlys[3]，它和引物结合位点复性结合而将病毒整合到宿主细胞中。正链 DNA 的合成分成两等份不连续地起始，其中一半起始于 3′端的多嘌呤位点（3′PPT），另一半起始于位于中间的多嘌呤位点（cPPT）。因此，在反转录时形成的正链上的短的重叠导致产生了一个三链重叠结构被称之为中部 DNA 振动。有报

道说中部DNA振动对于在非分裂细胞中形成前整合复合物起到了关键性的作用(Sirven et al. 2000；Zennou et al. 2000)。不过，也有其他研究表示cPPT变异的病毒能够完全感染非分裂细胞（Dvorin et al. 2002；Limon et al. 2002)。

## Rev反应元件

在宿主细胞中表达的HIV-2载体的RNA需要以一种未被剪切的RNA方式从细胞核运输到细胞质。这就需要Rev反应元件（REV）提供的顺式作用和Rev蛋白提供的反式作用（Malim and Cullen 1993)。Rev蛋白通过其富含精氨酸赖氨酸的区域与REV结合，而它的富含亮氨酸的核输出序列（NES）与核输出蛋白CRM-1结合。这些相互作用使得含有Rev/REV的载体RNA复合物能被运输到细胞质中（见综述Vaishnav and Wong-Staal 1991；Tang et al. 1999)。基于这些原因，REV位点必须被合并到质粒RNA中（图3A)。

## 包装信号（ψ）

输出到细胞质后，载体RNA需要被包装成可以感染的病毒颗粒用于作为基因转运的载体。病毒颗粒和载体RNA的包装需要一个顺式作用元件命名为ψ或者是包装信号(Arya 1998；Garzino-Demo et al. 1995；Poeschla et al. 1998；D'Costa et al. 2001)。通过对HIV-2片段删除分析已经将ψ信号定位到剪切供体位点的上游区域（McBride et al. 1997)。不过，其他的研究表明位于主要剪切供体位点下游的区域在包装中也发挥作用（Poeschla et al. 1998）并作为一种负调子（Garzino-Demo et al. 1995)。因此，对于HIV-2的有效包装，ψ信号和gag的短延伸片段都是必需的（约250bp；图3A)。

### 包装载体

HIV-2载体RNA包含所有载体复制的顺式作用元件和转基因表达框。所有顺式作用的病毒结构和复制蛋白都是由包装质粒提供的（图3B)。HIV-2包装质粒包含编码Gag和Pol蛋白以及Tat和Rev蛋白的序列。这些蛋白质的互补使得载体RNA能够完成转录，输出和包装。同时，包装质粒包含一个ψ信号缺失，排除了它整合到载体颗粒中的可能。HIV-2包装质粒也不含有*vif*、*vpx*、*vpr*和*nef*基因以及一个约700bp的包膜片段。有趣的是，HIV-2载体可以被HIV-1和FIV包装系统交叉包装(Browning et al. 2001；Morris et al. 2004)。HIV-1或者FIV对HIV-2载体的交叉包装方案与同源HIV-2相同，只是将HIV-2包装质粒换成HIV-1或者FIV包装质粒（图2)。当使用HIV-2载体和FIV蛋白作为治疗应用时，使用交叉包装载体能够提供一层额外的安全保护作用。

### 包膜质粒

倾向于结合到$CD4^+$细胞的HIV-2包膜被删除掉了，取而代之的是一个异源的薄膜基因拓宽了HIV-2载体的细胞倾向性并拥有不同的选择。通常情况下，使用的是疱疹性口炎病毒G（VSV-G）糖蛋白，因为它具有更广的倾向性并且对于大多数靶细胞有着很高的感染效率（图3C)。尽管如此，其他的病毒包膜蛋白，如异嗜性病毒和双嗜性

反转录鼠源病毒也可以使用。

## HIV-2 载体的治疗前景

HIV 和莫洛尼氏鼠白血病病毒（Mo-MLV）载体都能够稳定地转染细胞。不过，HIV 反转录病毒载体有着明显的优点。例如，Mo-MLV 载体由于降低了转基因的表达效率，并由于其能够整合到活跃的基因启动子区域使得转染细胞容易患病，癌变使得它的应用比较麻烦（Wu et al. 2003）。另一方面，慢病毒倾向与结合到活跃的启动子的下游活性转录单元内，从而降低了它的致癌能力（Wu et al. 2003）。此外，慢病毒载体能转导非分裂细胞，因为它们的预结合复合物能够横穿完整的核膜（Buchschacher and Wong-Staal 2000；Greber and Fassati 2003）。这个特性对于治疗神经细胞很有价值，因为它们是一群不活跃的非分裂细胞。使用慢病毒源载体如 HIV-1 和 HIV-2 的最后一个优点就是它们能够被特异地用于 HIV 的治疗。这些载体本身具备抗病毒的能力，因为它们可以和野生型病毒竞争包装和反式作用元件，同时它们也可以移动和扩散到病毒感染的靶细胞中去。

慢病毒载体如那些基于 HIV-1、HIV-2/SIV，或者是 FIV 的产生过程如图 2 中所描述的那样，它们能够稳定转导许多类型的细胞，包括 $CD34^+$ 造血祖细胞（Gervaix et al. 1997），然后整合并表达目的基因（Poeschla et al. 1996；Price et al. 2002；Quinonez 和 Sutton 2002；Yam et al. 2002）。目前使用慢病毒载体治疗 HIV-1 的试验方案是先将表达有抗 HIV 特征的 siRNA 或者核酸酶的载体在体外转导到初级 T 细胞或者是相关的静止期的造血干细胞（HSC）（综述见 Morris and Rossi 2004）中，然后在骨髓细胞清除后将转染培养物灌输到感染患者体内。一个类似的试验已经在狒狒的体内开展过，结果证明还需要多个生长因子来使 HSC 重新成群生长（Horn et al. 2002）。尽管原因还没有完全清楚，基于 HIV-1 和 HIV-2 的载体系统要比 FIV 载体具有更好的转移和在 HSC 和人 T 细胞中表达外源转基因的效率（Price et al. 2002；Yam 2002），这些候选的载体系统都可以用于 HIV-1 感染的基因治疗方案中。尽管 FIV 载体能够转导靶基因到 HSC 中，它们的表达似乎受到极大的限制（Price et al. 2002）。

近来发现，HIV-1 和 HIV-2 能够相互交叉包装（White et al. 1999；Browning et al. 2001；Goujon et al. 2003），FIV 也可以包装 HIV-1 和 HIV-2 慢病毒载体（Morris et al. 2004）。FIV 包装的 HIV-2 载体包含 4 个针对 HIV-1 的核酶，能够稳定转导并保护被 HIV-1 感染的人初级血单核细胞（Morris et al. 2004）。这些相对较新的关于慢病毒载体之间相互包装的观测给人们提供了一个可供选择的将各种载体的优点联合起来的方法。例如，FIV 包装 HIV-1 或者 HIV-2 载体降低了由于 HIV 结构蛋白引起的免疫识别或者是血清转化的可能性。同时，在一些特殊的细胞如干细胞中，HIV 载体能够极大地增加相关 FIV 载体的靶基因的表达（Price et al. 2002）。因此，FIV 包装的 HIV-2 载体能够同时降低血清转化和免疫识别，同时在转导的 HSC 细胞中保持最高的转基因表达效率。最后，慢病毒载体可以用作模型（Kobinger et al. 2001；Sandrin et al. 2003）被设计成用受体-配体桥（Boerger et al. 1999）来针对特异的靶细胞类型。

## 方案

# 基因转运用的 HIV-2 载体颗粒的产生

HIV-2 载体的生成和包装可以从 HIV-2 前病毒克隆中获得，其中一些是由美国国家感染与免疫疾病研究所的 AIDS 研究和参考试剂计划提供（http://www.aidsreagent.org）的。许多研究组已经建立了各种版本的相关 HIV-2 载体和包装质粒，所以要得到这些材料可以直接和研究人员联系（Arya et al. 1998；Morris et al. 2004）。CMV 表达的 VSV-G 蛋白包膜质粒可以从许多商业来源中获得。这三个质粒共转染到宿主细胞中，过一段时间就可以收集相关的病毒。

## 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

$CaCl_2$（1mol/L）<！>

转化和转导细胞系：293T 细胞或者 293 FT 人胚肾细胞

生成 HIV-2 载体颗粒的 DNA

- HIV-2 载体 DNA
- 包装载体（HIV-1、HIV-2 或者 FIV）
- 包膜质粒（VSV-G）

含有 10%胎牛血清 FBS、氨基酸、抗生素、抗菌素混合物的 DMEM 培养基

2×HBS

- 1g HEPES 酸（Sigma-Aldrich H3375）
- 1.6g NaCl
- 0.72ml 0.25mol/L $Na_2HPO_4$<！>
- 1ml 1mol/L KCl <！>
- 加入到 100ml 双蒸水中，用 NaOH<！>（5mol/L 和 1mol/L）精确调节 pH 到 7.12。

含有 2%多聚甲醛<！>的 PBS

PBS

聚凝胺储存液（海美溴铵；8mg/ml 溶解在 PBS 中）

胰酶<！>

### 设备

流式细胞仪

荧光显微镜

转头

- 45Ti 固定角转头（Beckman-Coulter）

41Ti 水平转头（Beckman-Coulter）

标准的组织培养设备，包括直径 100mm 的组织培养皿和 12 孔板

滤器（0.45μm 孔径）

台式离心机

## 方法

### HIV-2 载体的生成（磷酸钙法）

1. 转染前一天，接种约 $4.0\times10^6$ 个 293T 细胞或者 293 FT 人胚肾细胞到直径 100mm 的组织培养皿中，加入 8～10ml 含 10% FBS、氨基酸、抗生素（如果需要）的 DMEM 培养基，放到 37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养过夜。
2. 转染前 1～2h 更换培养基。
3. 准备磷酸钙-DNA 共沉淀。将 15μg HIV-2 载体 DNA，10μg 包装载体（HIV-1、HIV-2 或者 FIV）和 5μg VSV-G 包膜质粒混合，然后加入 374μl 无菌水和 126μl 1mol/L $CaCl_2$ 到质粒混合物中。
4. 把铺好的 293T 宿主细胞从培养箱拿到组织培养操作台。
5. 在混合步骤 3 中的质粒混合物的同时，用 1ml 的移液管吸取 500μl 2×HBS 逐滴加入到其中。用同样的移液管把磷酸钙-DNA 悬液逐滴加入到宿主细胞中。然后放回培养箱继续培养。
6. 培养 6～8h 后，将培养皿中的培养基轻轻去除，更换成 10ml 新鲜培养基。

### 收集载体颗粒

7. 转染 2d 以后，将培养基上清取出放到一个 50ml 的圆锥管中，更换新鲜培养基。将上清保存到 4℃。
8. 转染 3d 以后，再一次收集上清放入前一次收集的保存在 4℃的样品中。如果细胞仍然活着，加入新鲜培养基，24h 以后再重复一次。
9. 用台式离心机 2800r/min 离心 15min，去除不需要的细胞残渣。将上清转移到一个新的离心管中，用一个 30ml 的注射器和 0.45μm 孔径的滤器过滤。将过滤好的上清分成 2ml 等份保存在－80℃，或者是像步骤 10～12 中描述的那样浓缩！

   将过滤的上清分成等份保存，可以避免在测定滴度的时候将所有保存的载体冻融。

### 载体浓缩

10. 将包含载体的过滤好的上清在 42 000*g*（在固定角转头 45Ti 中为 19 000r/min）离心 2h。
11. 去除上清，将离心管倒置到一个无菌纱布上，干燥 2min。
12. 将管壁用无菌纱布擦干，然后用 20～50μl 1×PBS 重悬，将所有的等份混合到一起，保存到－80℃到需要使用时为止。

    载体可以保持一年，更长的保存时间将会降低载体的滴度。

## 病毒滴度测定

病毒滴度可以使用各种细胞类型来测定。本方案假定使用293T细胞进行测定，并且以绿色荧光蛋白（GFP）的表达作为标志（图2）。

13. 在测定病毒滴度的前一天，将293T细胞以 $2\times10^4\sim4\times10^4$ 个/孔的密度接种到一个12孔板中。放到37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养过夜。
14. 滴度检测当天，先准备一系列1.0ml载体培养基稀释液（5～10倍的间距），从 $10^2\sim10^6$ 颗粒/ml，并且含有8μg/ml的1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物（Polybrene）。数出12孔中每一个孔的细胞数，并重复3次，得出转导前的细胞数。将稀释好的载体加入到相关的孔中培养过夜。

    预期的滴度大约是 $10^6$ 转染单位/ml。
15. 第二天，吸去培养基，更换成新鲜培养基。将细胞继续培养2～4d。
16. 去除培养基，加入500μl胰酶，室温下孵育1～2min。去除胰酶，轻轻敲松细胞，用1ml PBS收集细胞。用含有2%多聚甲醛的PBS固定样品和阴性对照。用流式细胞仪检测样品中GFP的表达。
17. 用每孔中的病毒颗粒数和GFP表达的细胞百分数作图，测定当50%的细胞表达GFP时所需要的稀释度，然后根据这个计算出载体保存液中的转染单位/ml的数目。

    另一个计算载体滴度的公式是

    TU/ml=（%GFP阳性细胞/100）×（转导细胞数）×（稀释因子）

## 转导贴壁细胞

18. 转导的前一天，接种贴壁细胞的密度在6孔板中约为 $1\times10^5$ 个/孔或者是 $4\times10^6$ 个在100mm的培养皿中。放到37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养过夜。
19. 转导当天，去除培养基。加入2ml不含FBS的培养基、1ml新鲜解冻的载体储存液、终浓度为8μg/ml的聚凝胺。放到37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养2h。
20. 吸去上清加入新鲜培养基到细胞中。放到37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养2～4d，用流式细胞仪或者是荧光显微镜分析GFP的表达。

## 转导悬浮细胞

21. 收集悬浮细胞，计数，用15ml的聚丙烯管在500*g*离心5min收集 $3\times10^6\sim5\times10^6$ 个细胞。
22. 用1ml不含FBS的培养基悬浮细胞沉淀。
23. 加入1ml新鲜解冻的载体储存液，轻轻混合。
24. 加入聚凝胺使终浓度为8μg/ml。
25. 将细胞/载体/聚凝胺混合物在1000*g*室温下离心2h。
26. 吸去上清加入新鲜培养基重悬细胞。放到37℃，5%的 $CO_2$ 培养箱中培养2～4d，用流式细胞仪分析或者是荧光显微镜GFP的表达。

# 致谢

作者感谢 David J. Looney 博士对 HIV-2 载体的设计和应用方面的深入讨论。

## 参考文献

Arya S.K. 1988. Human and simian immunodeficiency retroviruses: Activation and differential transactivation of gene expression. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **4:** 175–186.

Arya S.K., Zamani M., and Kundra P. 1998. Human immunodeficiency virus type 2 lentivirus vectors for gene transfer: Expression and potential for helper virus-free packaging. *Hum. Gene Ther.* **9:** 1371–1380.

Azevedo-Pereira J.M., Santos-Costa Q., and Moniz-Pereira J. 2005. HIV-2 infection and chemokine receptors usage—Clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr. HIV Res.* **3:** 3–16.

Barre-Sinoussi F., Chermann J.-C., Rey R., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., and Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220:** 868–871.

Boerger A.L., Snitkovsky S., and Young J.A.T. 1999. Retroviral vectors preloaded with a viral receptor-ligand bridge protein are targeted to specific cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 9867–9872.

Browning M.T., Schmidt R.D., Lew K.A., and Rizvi T.A. 2001. Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J. Virol.* **75:** 5129–5140.

Buchschacher G.L., Jr. and Wong-Staal F. 2000. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* **95:** 2499–2504.

———. 2001. Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.* **12:** 1013–1019.

Clavel F., Brun-Vezinet F., Guetard D., Chamaret S., Laurent A., Rouzioux C., Rey M., Katlama C., Rey F., Champelinaud J.L., et al. 1986a. LAV type II: A second retrovirus associated with AIDS in West Africa (in French). *C.R. Acad. Sci. III* **302:** 485–488.

Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., et al. 1986b. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233:** 343–346.

Coffin J.M. 1996. Retroviridae: The viruses and their replication. In *Fields virology* (ed. B.N. Fields, et al.), pp. 1767–1847. Raven Press, New York.

D'Costa J., Brown H., Kundra P., Davis-Warren A., and Arya S. 2001. Human immunodeficiency virus type 2 lentiviral vectors: Packaging signal and splice donor in expression and encapsidation. *J. Gen. Virol.* **82:** 425–434.

Dvorin J.D., Bell P., Maul G.G., Yamashita M., Emerman M., and Malim M.H. 2002. Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* **76:** 12087–12096.

Gallo R.C., Salahuddin S.Z., Popovic M., Shearer G.M., Kaplan M., Haynes B.F., Palker T.J., Redfield R., Oleske J., Safai B., et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224:** 500–503.

Gao F., Yue L., Robertson D.L., Hill S.C., Hui H., Biggar R.J., Neequaye A.E., Whelan T.M., Ho D.D., Shaw G.M., et al. 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: Evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* **68:** 7433–7447.

Garzino-Demo A., Gallo R.C., and Arya S.K. 1995. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2): Packaging signal and associated negative regulatory element. *Hum. Gene Ther.* **6:** 177–184.

Gervaix A., Schwarz L., Law P., Ho A.D., Looney D., and Wong-Staal F. 1997. Gene therapy targeting peripheral blood CD34+ hematopoietic stem cells of HIV-infected individuals. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2229–2238.

Goujon C., Jarrosson-Wuilleme L., Bernaud J., Rigal D., Darlix J., and Cimarelli A. 2003. Heterologous human immunodeficiency virus type 1 lentiviral vectors packaging a simian immunodeficiency virus-derived genome display a specific postentry transduction defect in dendritic cells. *J. Virol.* **787:** 9295–9304.

Greber U.F. and Fassati A. 2003. Nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic* **4:** 136–143.

Horn P.A., Morris J.C., Bukovsky A.A., Andrews R.G., Naldini L., Kurre P., and Kiem H.-P. 2002. Lentivirus-mediated gene transfer into hematopoietic repopulating cells in baboons. *Gene Ther.* **9:** 1464–1471.

Kobinger G.P., Weiner D.J., Yu Q., and Wilson J.M. 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19:** 225–230.

Limon A., Nakajima N., Lu R., Ghory H.Z., and Engelman A. 2002. Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J. Virol.* **76:** 12078–12086.

Logan A.C., Haas D.L., Kafri T., and Kohn D.B. 2004. Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J. Virol.* **78:** 8421–8436.

Malim M.H. and Cullen B.R. 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: Implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **13:** 6180–6189.

Mautino M.R. and Morgan R.A. 2002. Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes. *AIDS Patient Care STDs* **16:** 11–26.

McBride M.S., Schwartz M.D., and Panganiban A.T. 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of *cis* elements required for encapsidation. *J. Virol.* **71:** 4544–4554.

Morris K.V. and Rossi J.J. 2004. Anti-HIV-1 gene expressing lentiviral vectors as an adjunctive therapy for HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* **2:** 185–191.

Morris K.V., Gilbert J., Wong-Staal F., Gasmi M., and Looney D.J. 2004. Transduction of cell lines and primary cells by FIV-packaged HIV vectors. *Mol. Ther.* **10:** 181–190.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Pettit S.C., Gulnik S., Everitt L., and Kaplan A.H. 2003. The dimer interfaces of protease and extra-protease domains influence the activation of protease and the specificity of GagPol cleavage. *J. Virol.* **77:** 366–374.

Poeschla E., Corbeau P., and Wong-Staal F. 1996. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11395–11399.

Poeschla E., Gilbert J., Li X., Huang S., Ho A., and Wong-Staal F. 1998. Identification of a human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) encapsidation determinant and transduction of nondividing human cells by HIV-2 based lentivirus vectors. *J. Virol.* **72:** 6527–6536.

Price M.A., Case S.S., Carbonaro D.A., Yu X.J., Petersen D., Sabo K.M., Curran M.A., Engel B.C., Margarian H., Abkowitz J.L., Nolan G.P., and Kohn D.B. 2002. Expression from second-

generation feline immunodeficiency virus vectors is impaired in human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **6:** 645–652.
Quinonez R. and Sutton R.E. 2002. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol.* **12:** 937–951.
Reinhart T.A., Rogan M.J., and Haase AT. 1996. RNA splice site utilization by simian immunodeficiency viruses derived from sooty mangabey monkeys. *Virology* **224:** 338–344.
Sandrin V., Russell S.J., and Cosset F.L. 2003. Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281:** 137–178.
Sirven A., Pflumio F., Zennou V., Titeux M., Vainchenker W., Coulombel L., Dubart-Kupperschmitt A., and Charneau P. 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* **96:** 4103–4110.
Tang H., Kuhen K.L., and Wong-Staal F. 1999. Lentivirus replication and regulation. *Annu. Rev. Genet.* **33:** 133–170.
Temesgen Z. 1999. Overview of HIV infection. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **83:** 1–5.
Vaishnav Y.N. and Wong-Staal F. 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* **60:** 577–630.
White S.M., Renda M., Nam N.Y., Klimatcheva E., Zhu Y., Fisk J., Halterman M., Rimel B.J., Federoff H., Pandya S., Rosenblatt J.R., and Planelles V. 1999. Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J. Virol.* **73:** 2832–2840.
Wiznerowicz M. and Trono D. 2005. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol.* **23:** 42–47.
Wu X., Li Y., Crise B., and Burgess S.M. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for mlv integration. *Science* **300:** 1749–1751.
Yam P.Y., Li S., Wu J.U., Hu J., Zaia J.A., and Yee J. 2002. Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **5:** 479–484.
Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L., and Charneau P. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101:** 173–185.

## 网络资源

http://www.aidsreagent.org/NIH AIDS Research and Reference Reagent Program

# 第五章 作为DNA递送媒介的SIV载体

Els Verhoeyen，François-Loïc Cosset 和 Didier Nègre
INSERM，U758，Lyon，F-69007 France；Ecole Normale Supérieure de Lyon，Lyon，F-69007 France；IFR128 BioSciences Lyon-Gerland，Lyon，F-69007 France
郭维锐 译



## 摘要

在基因治疗研究中，如何得到一个适合体内基因转运的载体是一个反复出现的问题。为了达到这个目的，一些具有挑战性的障碍必须跨越。第一，载体必须具有较高的滴度。第二，为了避免失活，基因转运载体应避免被宿主免疫系统识别。第三，载体必须在占体内绝大部分不繁殖和繁殖缓慢的细胞中复制和表达转运的基因。

由猴免疫缺陷病毒发展来的慢病毒载体是由一些实验室合成的（Negre et al. 2002）。这些载体的特点显示它们与那些由人免疫缺陷病毒（HIV-1或者HIV-2）发展来的病毒在把转基因插入到非分裂细胞中的特征是类似的。尽管如此，越来越清晰的证据显示SIV载体和HIV-1相比在猴细胞中效果更好（Negre et al. 2000），因此，给慢病毒载体的初级非人体模型的早期临床试验提供了一个有效的取代HIV-1载体的选择。本章将提供一些如何使用微型SIV包装系统和SIV基因转移载体来获取由SIV发展来的高滴度和安全的慢病毒载体的方法。

## 引言

### SIV原病毒基因组：设计源于SIV的载体的关键点

尽管存在一些例外，SIV的基因组结构和HIV-1以及HIV-2非常相似（Gardner et al. 1993；Clements and Zink 1996）。SIV原病毒基因组（图1A）由两个末端重复序列（LTR）以及与之侧翼相连的编码形成病毒颗粒的结构基因 *gag*、*pol* 和 *euv* 的编码区组成。和人类的慢病毒一样，SIV占有两个调节蛋白，Tat和Rev，用来控制病毒基因组在转录和转录后的表达。大多数SIV病毒株表达病毒因子和附属蛋白Vpr、Vpx、Vif和Nef，这些蛋白质在细胞培养中对病毒的致病性很重要，但是对病毒的复制没有

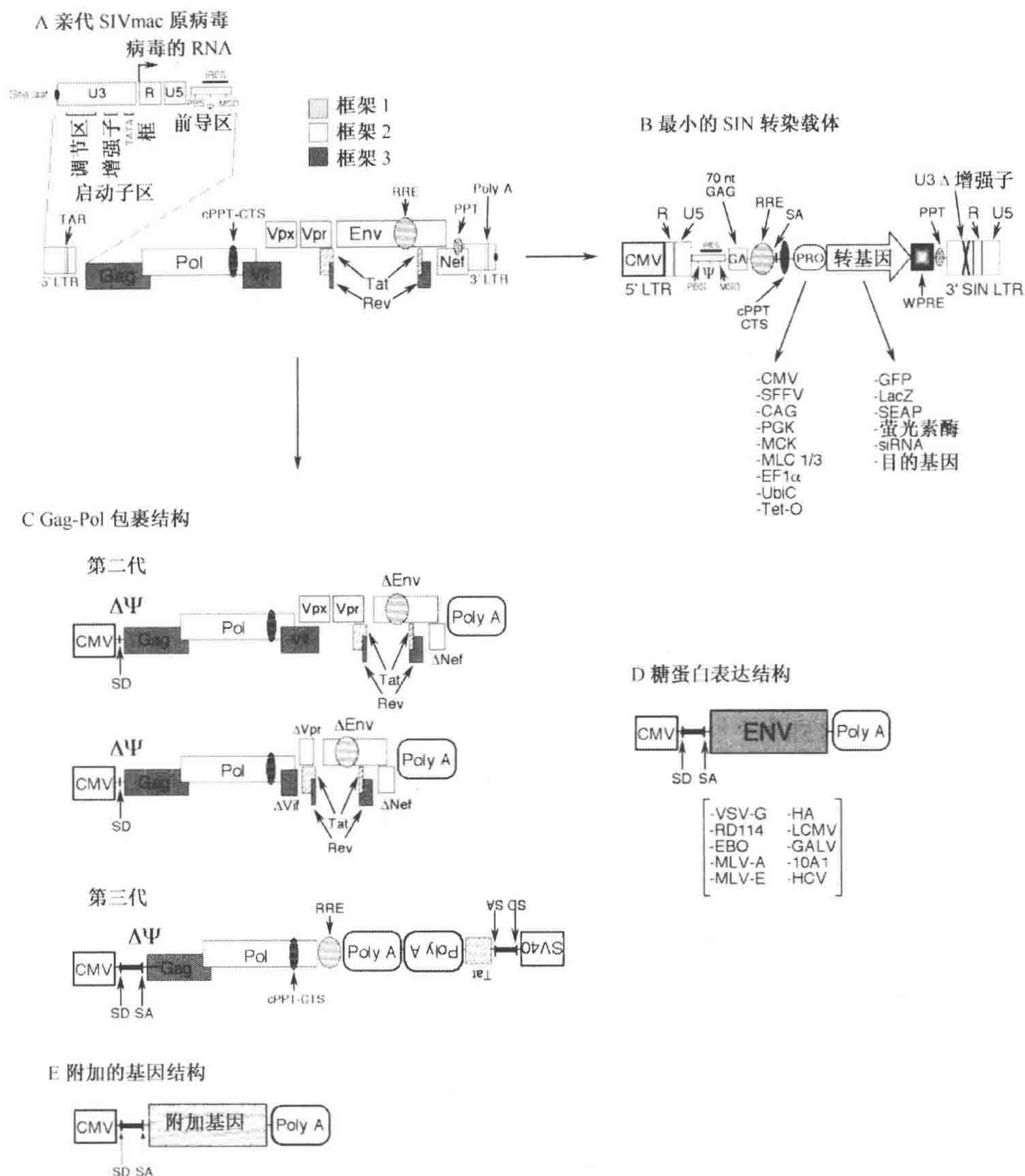



图 1．来源于 SIV 的载体的产生。SIV 的感染性分子克隆基因组 A 被分解，获得携带转移载体的结构 B 和编码装配功能的结构 C。产生的不同版本的 Gag-Pol 装配结构常用于去除对载体颗粒不必要的病毒序列。一种相似的方法被用来优化足量、安全的转运载体。图中只画出了微型的转运载体。（open box）顺式作用元件、（closed box）病毒基因、（LTR）长末端重复序列、（CMV）人类细胞巨化病毒早期启动子、（PBS）引物结合位点、（MSD）主要剪接供体位点、（Ψ）装配序列、（cPPT/CTS）中心的多聚嘌呤径迹和中心的末端序列、（RRE）Rev 反应元件、（PolyA）多腺苷酸化位点、（SD）剪接供体位点、（SA）剪接受体位点、（SV40）猿病毒 40 早期启动子、（IRES）内部核糖体进入信号、（Pro）内部启动子。杂乱的文章显示，SV40-Tat-PolyA 表达盒是反义方向的，称为 CMV-gagpol-PolyA 盒。表达病毒糖蛋白（ENV、D）和（或）Rev 附属蛋白的表达结构也设计出来了。通过质粒驻留在包膜结构（Gag-Pol/Tat/Env/Rev）的共转染和载体转移到 293 细胞中生产载体颗粒。在短暂的表达期间收集转染细胞的上清液，并用来转导靶细胞。

什么作用。*vpx*基因在 HIV-2 中表达，但是在 HIV-1 病毒株中不存在。在宿主细胞中表达这些附属基因对于载体的能力有着重大的影响（Mangeot et al. 2002)。和所有的反转录病毒一样，SIV 的 LTR 分成 U3、R 和 U5 这几个区域。U3 中的信号序列调节转录的起始和水平。R 区域包含顺式作用元件和对于由病毒编码的 Tat 蛋白反式活化调节基序很重要的反式作用（TAR）序列。TAR 元件和 Tat 蛋白结合形成一个稳定的二级结构作为细胞因子的一个复合物使得病毒的转录得到延伸。R 区域同时也包含了 SIV 的 RNA 的多聚腺苷酸位点。病毒 RNA 的一个必要的决定子，包装序列，将 RNA 基因组的两个拷贝包装到病毒颗粒里面（Guan et al. 2000)；位于 R-U5 区域的 *gag* 基因的起始部分的附加序列也被认为是这个重要基序的一部分（Das et al. 1997；Kaye and Lever 1998；Dorman and Lever 2000)。

反转录需要一些 *cis* 作用元件的存在来起始 DNA 的合成。它们包括（图 1A)：①引物结合位点（PBS)，它位于 5′LTR 和 *gag* 之间的引导区域的起始部分，能够和 tRNA结合开启原病毒 DNA 负链的合成；②中央多嘌呤位点（cPPT）和 3′PPT 区域，它们可以开启病毒 DNA 正链的合成；③在各种慢病毒株中位于 PPT 下游的保守的富含尿嘧啶的区域（Ilyinskii and Desrosiers 1998)。在反转录的过程中，3′U3 区域用于作为 5′LTR 和 3′LTR 的 U3 区域合成的模板。两端 LTR 的整合酶的相互作用使得病毒 DNA 能够插入到宿主细胞染色体中。

## 优化 SIV 转运载体

源于 SIV 的能够复制的载体是通过把异源序列取代 *nef* 基因而产生的（Giavedoni and Yilma 1996)。这些载体不但可以复制自己的基因组，还可以把转基因插入到它们的基因组中。尽管由于 *nef* 基因的缺失，它们表现出来的能力较弱或者是没有起初病毒的致病能力，这些载体仍然不适合绝大部分基因治疗应用，事实上它们已经被设计成一种治疗 AIDS 的活弱化疫苗（Ruprecht 1999)。

通常情况下，通过删除病毒的关键基因包括病毒复制基因如 *gag-pol* 和 *env* 等可使反转录病毒呈现出复制缺陷的形态。转基因和一些调节元件（启动子、增强子和内含子序列）被插入到缺失的被称为转运载体的病毒中（图 1B)，它仍旧保留着病毒顺式作用元件如 LTR、包装序列，以及在反转录中涉及的区域（PBS 和 PPT)。在所有的反转录病毒基因组中，载体中的一些不可或缺的顺式作用序列和反式作用区域互相交叠（图 1A)。因此，大部分转运载体仍旧包含了一些父本病毒基因中的残余序列，但是它们的编码能力已经丢失了。这是事实，例如，包装序列延伸到 *gag* 基因内部，Rev 反应元件（RRE）区域位于 *env* 基因编码序列中，cPPT/CTS（中部终止子序列）序列位于 *pol* 基因，以及 PPT 序列衍生到 *nef* 基因中（图 1A)。这些包装和载体基因组之间的冗余序列应该尽量避免，或者是最大限度地降低，以免含有反式作用功能的包装基因组和病毒基因组重组。事实上，尽管在晚期的基因组形态中大多数包装序列缺失，但低度的包装仍旧发生（Patience et al. 1998)。

考虑到这些因素，近来一些转运载体和包装基因组都起源于不同类型的病毒如 SIV、SIVmac251（Mangeot et al. 2000；Negre et al. 2000；Schnell et al. 2000；Wagner et al. 2000）和 SIVagm（Nakajima et al. 2000；Stitz et al. 2001)。有效地繁殖这

些不同的载体的最低结构要求如图 1B 所示。用野生型或者是杂交 5′LTR 可以表达转运载体的基因组 RNA，这个过程需要在宿主细胞中表达 Tat 蛋白用于反转录（Mangeot et al. 2000；Negre et al. 2000）。载体仍旧保留着 RRE 序列，尽管它在载体骨架中的存在是可有可无的（Schneider et al. 1997；Mangeot et al. 2000；Schnell et al. 2000）。进一步的 *gag* 基因和引导区域 3′端的缺失对载体的滴度有着非常强烈的副作用（Mangeot et al. 2000）。载体整合到靶细胞中后，转基因就可以由内部转录单元有效地被转录，不需要 Tat/TAR 和 Rev/RRE 序列来选择性表达。这就允许载体的结构可以拥有包含转录因子和 TATA 框位点的 3′LTRU3 区域的缺失（图 1B），从而使得在靶细胞中经过一轮反转录和整合的过程后 5′LTR 的转录能力可以极大地降低（Mangeot et al. 2000；Nakajima et al. 2000；Schnell et al. 2000）。这些自我失活（SIN）载体提供一些优点，如①当使用复制活性反转录病毒（PCR）共感染的时候可以阻止载体的漂移；②消除在靶细胞中表达转基因对 Tat 蛋白的需求；③降低 SIV LTR 和内部启动子的相互干扰，如插入到载体骨架中的组织特异的或者是可调节内部启动子（Mangeot et al. 2002）。其他的顺式作用元件，包括增加 RNA 输出或者是其他的转录后调节（Belshan et al. 2000）以及转基因表达（Zufferey et al. 1999）的序列，被插入到 SIV 载体中，可以以一种靶细胞类型依赖的方式提高载体的效率（Mangeot et al. 2002）。由于载体的特异结构，我们可以得到高于 $10^7$ 个/ml 的病毒滴度。

## 微型包装基因组

作为复制缺陷型的病毒颗粒，为了繁殖转运载体，必须使反式互补基因组提供转于载体中所缺失的基因所表达的反式作用蛋白（图 1C）。反式互补基因组，也被称为包装载体，被设计为不能自我复制。通过移除属于初级反转录病毒的顺式作用序列，如包装序列、PBS 和 PPT 区域和两端的 LTR 区，可以成功地实现这点。包装基因组的这些修饰在实践中可以充分保障组织 SIV 基因转移到靶细胞中（Mangeot et al. 2000）或者是形成 PCR（Negre et al. 2000）。另外，包装蛋白通常由两个分开的完全互补的基因组编码，一个编码 Gag-Pol 蛋白，另一个编码不需要起源于父本慢病毒的病毒糖蛋白（图 1D）。两个基因组在物理上的分开可以降低轻易允许不同病毒起源的糖蛋白的相互交换的重组、漂移的可能性，从而确保高度的生物安全性。广泛使用的第 2 代、第 3 代包装载体在图 1C 中展示出来了。由于第 2 代包装载体的构造仍然包含大部分附属基因，与父本 SIV 基因组有高度的相似性，因此被认为是不安全的。第 3 代包装载体的构造仅仅包含编码结构蛋白的基因（Negre et al. 2000；Wagner et al. 2000）。

## 含有异源包膜糖蛋白的假型 SIV 载体

对于同源病毒糖蛋白来说，插入到反转录病毒的蛋白质并不是特异的。此外，许多异源病毒糖蛋白能够插入到反转录病毒中调节感染效率（Swansrom and Wills 1997）。这个过程被称为假型，使得反转录载体能够转导到更多的细胞和组织中。通过组成型的强启动子可以在包装缺陷载体中表达糖蛋白（图 1D）。在 Gag-Pol 包装载体和转运载体的构造中没有同源序列，从而最大化地降低了产生那些含有编码糖蛋白基因的重组病毒的可能性。

慢病毒载体可以用不同可供选择的病毒糖蛋白来使之变成一种假型，对于开发具有这个特点的慢病毒载体来说，有些因素是需要考虑的（Mochizuki et al. 2001；Salmon et al. 2000；Stitz et al. 2000；Christodoulopoulos and Cannon 2001；Desmaris et al. 2001；Kobinger et al. 2001；Lewis et al. 2001；Sandrin et al. 2002）。这一参数可用来调节载体的物理化学特点、它们和宿主免疫系统的相互作用以及它们的宿主范围。一些研究表明靶细胞的转导效率取决于用在反转录载体外膜上的糖蛋白的类型（Porter et al. 1996；Marandin et al. 1998；Movassagh et al. 1998；Kelly et al. 2000；Gatlin et al. 2001；Goerner et al. 2001；Sandrin et al. 2002）。此外，一些体内基因转移应用要求载体能够针对特殊的细胞进行穿透并且（或者）能够在系统给药之后表达（Peng et al. 2001）。慢病毒载体大部分是由疱疹性口炎病毒（VSV)-G 发展而来的，因为它的糖蛋白能简化回收和浓缩假型病毒载体的过程（Burns et al. 1993；Naldini et al. 1996）。尽管如此，这些载体也有缺陷也许会限制它们在系统性基因转运中的应用。由于 VSV-G 受体（一个质膜的脂质成分）的广泛分布（Seganti et al. 1986），VSV-G 假型病毒在接种后到达靶细胞之前可能会结合到所有遇到的细胞表面。而且，VSV-G 假型病毒可以被人类血清迅速失活（DePolo et al. 2000；Sandrin et al. 2002）。基于这些原因，最近已经探讨了用几种不同的糖蛋白来产生假型的 SIV 载体（Negre et al，2000；Sandrin et al. 2002）。

### 组装 SIV 载体颗粒总结

尽管存在一个可供选择的新的模式，即依赖可诱导的包装细胞系来产生 SIV 载体，通常，慢病毒载体是通过在高度易被转染的细胞中（如 293T 细胞）的瞬式表达来制备的（Kuate et al. 2002）。

转运载体和包装载体在共转染的细胞中表达使得包装好转运载体基因组的复制缺陷的病毒颗粒释放在培养基的上清中。它们通常大量地产生，在被用于转导靶细胞之前需要被浓缩和纯化。重组的病毒保留着通过病毒糖蛋白识别一个特异的受体从而进入细胞并将遗传物质永久整合到宿主基因组的能力，因此确保了基因转运的效率和长效性。由于没有复制组分的病毒被用于组成缺陷载体，反转录病毒介导的基因转运是一个单通道的操作。从而导致插入一个到少数几个转基因拷贝到宿主细胞基因组中。

## 方案

## 基因转运用的 SIV 载体颗粒的生产

这个方案描述了 SIV 载体的产生和测量基因转导效率的分析方法。另外，也包括了探测 PCR 的方法和检测含有绿色荧光蛋白（GFP）的 SIV 载体的可能移动的技术。安全分析使用的是 sMAGI 靶细胞，该细胞允许 SIVmac251 的复制，并能拥有一个由 SIV/HIV *tat* 诱导的 HIV1 驱动的稳定整合的 *LacZ* 转录单元（Chacherian et al. 1995）。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

牛血清白蛋白（BSA 第 5 组分）

1%的 BSA 溶解在 PBS 中作为冰冻培养基，保存在 4℃。

用于磷酸钙转染的 Calphos 哺乳动物转染试剂盒

转染和转导细胞系

293T 细胞

TE671 细胞（人横纹肌肉瘤，ATCC CRL-8805）

sMAGI 短尾猿细胞

这些细胞应该允许 SIVmac251 复制，并且拥有一个稳定整合的由 SIV/HIV *tat* 诱导的 HIV-1 LTR 驱动的 *lacZ* 转录单元。sMAGI 细胞生长培养基为 DMEM/10% FCS/潮霉素（50μg/ml）/G418（200μg/ml）。

含有 0.11g/L 的维生素 B6 钾盐和维生素 B6 的 DMEM 培养基

在 DMEM 中加入 10% FCS、100μg/ml 链霉素<!>和 100μ/ml 青霉素，保存在 4℃。

灭活的胎牛血清（FCS）

G418（100mg/ml 溶解在水中，Geneticin；Invitrogen）<!>

用 0.22μm 孔径滤膜过滤，保存在－20℃。

戊二醛溶液（0.5%溶解在 PBS 中，保存在 4℃）<!>

溶解在 PBS 中的潮霉素 B（50mg/ml，保存在 4℃，Invitrogen）<!>

核酸

慢病毒载体 DNA，用一个选择性的内部启动子编码慢自我失活载体，并编码报道基因 GFP

在内部转录框中选择启动子应该要基于启动子在相关靶细胞中的特性。

包膜糖蛋白表达载体（如 VSV-G）

病毒结构蛋白（Gag-Pol）表达载体

多聚甲醛溶液（4%，溶解于 PBS，室温保存）<!>

不含钙、镁和碳酸氢钠的无菌 PBS 溶液

聚凝胺储存液（海美溴铵；8mg/ml 溶解在 $H_2O$ 中；Sigma-Aldrich）

胰酶

胰酶-EDTA 溶解在不含钙和镁的无菌的 1×Hank 平衡液中

维尔烯 1∶5000（Invitrogen）

X-gal 缓冲液

43.5mmol/L 脱氧胆酸钠（一水化合物；Sigma-Aldrich）<!>

2mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（Sigma-Aldrich）<!>

5mmol/L 铁氰化钾（Sigma-Aldrich）<!>

5mmol/L 高铁氰化钾（Sigma-Aldrich）<!>

0.002% NP-40（Roche Diagnostics）

溶解在 PBS 中。对于 sMAGI 细胞，用 NaOH 调节 pH 到 9.0<!>

X-gal（5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷）（Euromedix）<!>

配成 60×储存液，用（DMF；Sigma-Aldrich）<!>稀释到终浓度为 40mg/ml。保存在 −20℃。在染色细胞之前，将 X-gal 添加到新鲜的 X-gal 缓冲液中。

### 设备

FACS Calibur 流式细胞仪（Becton Dickinson）

流式管（Becton Dickinson）

荧光显微镜

滤膜（0.45μm 孔径）

反转录酶分析试剂盒（Roche Diagnostics）

标准的组织培养设备，包括 100mm 和六孔培养皿

超速离心管（26ml，25mm×89mm，聚异质同晶体，Beckman）

## 方法

### 生产，浓缩和保存 SIV 载体颗粒

1. 转染前一天：铺约 $2.4\times10^6$ 个 293T 细胞到直径 100mm 的组织培养皿中，保持 12ml/皿的终体积。
2. 转染当天：将 8.1μg SIV 包装载体、8.1μg 转运载体和 2.5μg 包膜表达载体用磷酸钙法转染。
3. 转染第二天：培养约 15h 后，将培养皿中的培养基轻轻去除，更换成 10ml 新鲜培养基。
4. 转染第三天：培养约 36h 后，收集病毒：低速离心培养基去除细胞残渣，用 0.45μm 滤膜过滤。

   过滤好的上清可以保存在−80℃。
5. 将上清转移到一个 26ml 的超速离心管中。用 70Ti Beckman 离心机在 4℃用 110 000*g*（32 000r/min）下离心 2h 收集病毒颗粒。
6. 去除上清，用 5ml PBS 清洗管壁。将离心管倒置在滤纸上 5min，让其干燥，然后擦干管壁。
7. 加入 1/100 最初的病毒上清的体积的冰冷的含有 1% BSA 的 PBS 重悬病毒颗粒，冰浴 2h。
8. 将病毒颗粒等份分到微型离心管中，保存到−80℃或者是液氮中。

   样品可以保存至少 6 个月而不影响病毒滴度。

### 转导分析

9. 前一天：接种 TE671 或者是 sMAGI 靶细胞到 6 孔板中，密度为 $4\times10^5$ 个细胞/孔，

终体积为 2ml/孔。

10. 当天：先用 1ml DMEM/10% FCS 准备一系列载体稀释液，在含有 6μg/ml 聚凝胺的条件下加入到细胞中。
11. 在 37℃孵育培养基至少 4h。吸去含载体的培养基，更换成 2ml 新鲜培养基。将细胞在 37℃条件下继续培养 72h。
12. 第 3 天：用胰酶消化细胞，用含 4%的多聚甲醛的 PBS 固定 30min，然后转移到流式管中。用流式细胞仪分析细胞。

    分析时，转导效率通常由用 1ml 病毒上清转导 $4\times10^5$ 靶细胞后 GFP 阳性细胞所占的百分比来决定。

    感染滴度用转染单位/ml 表达，可以用下列公式进行计算：

    Titer＝%*inf*× （$4\times10^5/100$） ×$d$

    式中，$d$ 表示病毒上清的稀释因子；%*inf* 表示用转导 5%～10%的 GFP 阳性细胞所需要的病毒上清来进行流式分析所测量出来的 GFP 阳性细胞的百分比。

    感染复数（moi）是指感染的病毒颗粒与靶细胞的比例。

## 载体的安全测试：检测 PCR

13. 前一天：接种 sMAGI 靶细胞到 6 孔板中，密度为 $4\times10^5$ 个/孔，终体积为 2ml/孔。
14. 当天：用 SIV 载体颗粒对 sMAGI 细胞进行初次感染。用 1ml DMEM/10% FCS 准备一系列载体稀释液，在含有 6μg/ml 聚凝胺的条件下加入到细胞中。培养 4h 后，吸去含载体的培养基，更换成 2ml 新鲜培养基。将细胞在 37℃条件下继续培养 72h。
15. 第 3 天：用胰酶消化细胞。
    a. 检测 GFP 阳性细胞的百分比：将 1/3 的细胞用含 4%的多聚甲醛的 PBS 固定 30min，然后用流式细胞仪分析细胞。
    b. 检测 β-半乳糖苷酶的表达：将另一个 1/3 的细胞重新接种到一个 24 孔板中，每孔的体积为 1ml。当细胞长满后，用 1ml 含 0.5%戊二醛的 PBS 固定 10min，然后用 1ml PBS 洗一遍，32℃条件下用 X-gal 溶液（pH 9.0）孵育 2h。
    c. 让最终的 PCR 扩散：将最后的 1/3 的细胞重新种到一个 6 孔板中，每孔的体积为 2ml。培养细胞 10～15d。
16. 第 14 天：在第 2 次感染前一天，接种 sMAGI 靶细胞到 6 孔板中，密度为 $4\times10^5$ 个/孔，终体积为 2ml/孔。
17. 第 15 天：用初次感染靶细胞的上清（从 13～18d 的感染培养基）来感染作为靶细胞的 sMAGI 细胞。37℃用 1ml 上清感染靶细胞 4h。更换成 2ml 正常的培养基。感染后将细胞在 37℃条件下继续培养 48～72h。检测反转录酶和 GFP 以及 β-半乳糖苷酶的活性。

    为了证明含 GFP 的 SIV 载体的运动的存在，展示 SIV 储存液不含有 PCR 和 *tat* 重组反转录病毒，在所有的试验的感染后的 48～72h 中，GFP 和 β-半乳糖苷酶都不应该表达。另外，在初次和二次感染细胞的过程中的上清中，反转录酶应该保持失活。作为试验中的阳性对照，可以用野生型 SIVmac251 感染 sMAGI 细胞，然后检测这个时间段中重组反转录病毒经历复制和扩增以后的反转录酶的活性以及 *tat* 基因的表达能力。

## 参考文献


Belshan M., Park G.S., Park G.S., Bilodeau P., Stoltzfus C.M., and Carpenter S. 2000. Binding of equine infectious anemia virus rev to an exon splicing enhancer mediates alternative splicing and nuclear export of viral mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 3550–3557.

Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8033–8037.

Chackerian B., Haigwood N.L., and Overbaugh J. 1995. Characterization of a CD4-expressing macaque cell line that can detect virus after a single replication cycle and can be infected by diverse simian immunodeficiency virus isolates. *Virology* **213:** 386–394.

Christodoulopoulos I. and Cannon P. 2001. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J. Virol.* **75:** 4129–4138.

Clements J. and Zink M. 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9:** 100–117.

Das A., Klaver B., Klasens B.I., van Wamel J.L., and Berkhout B. 1997. A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J. Virol.* **71:** 2346–2356.

DePolo N.J., Reed J.D., Sheridan P.L., Townsend K., Sauter S.L., Jolly D.J., and Dubensky T.W., Jr. 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* **2:** 218–222.

Desmaris N., Bosch A., Salaun C., Petit C., Prevost M.C., Tordo N., Perrin P., Schwartz O., de Rocquigny H., and Heard J.M. 2001. Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol. Ther.* **4:** 149–156.

Dorman N. and Lever A. 2000. Comparison of viral genomic RNA sorting mechanisms in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **74:** 11413–11417.

Gardner M., Endres M., and Barry P. 1993. The simian retroviruses SIV and SRV. In *The retroviridae* (ed. J. Levy), vol. 3, pp. 133–276. Plenum Press, New York.

Gatlin J., Melkus M.W., Padgett A., Kelly P.F., and Garcia J.V. 2001. Engraftment of NOD/SCID mice with human $CD34^+$ cells transduced by concentrated oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *J. Virol.* **75:** 9995–9999.

Giavedoni L. and Yilma T. 1996. Construction and characterization of replication-competent simian immunodeficiency virus vectors that express gamma interferon. *J. Virol.* **70:** 2247–2251.

Goerner M., Horn P.A., Peterson L., Kurre P., Storb R., Rasko J.E.J., and Kiem H.P. 2001. Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with $CD34^+$ marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood* **98:** 2065–2070.

Guan Y., Whitney J., Diallo K., and Wainberg M.A. 2000. Leader sequences downstream of the primer binding site are important for efficient replication of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **74:** 8854–8860.

Ilyinskii P. and Desrosiers R. 1998. Identification of a sequence element immediately upstream of the polypurine tract that is essential for replication of simian immunodeficiency virus. *EMBO J.* **17:** 3766–3774.

Kaye J.F. and Lever A.M. 1998. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: A possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J. Virol.* **72:** 5877–5885.

Kelly P., Vandergriff J., Nathwani A., Nienhuis A.W., and Vanin E.F. 2000. Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* **96:** 1206–1214.

Kobinger G.P., Weiner D.J., Yu Q.C., and Wilson J.M. 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19:** 225–230.

Kuate S., Wagner R., and Uberla K. 2002. Development and characterization of a minimal inducible packaging cell line for simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors. *J. Gene Med.* **4:** 347–355.

Lewis B.C., Chinnasamy N., Morgan R.A., and Varmus H.E. 2001. Development of an avian leukosis-sarcoma virus subgroup A pseudotyped lentiviral vector. *J. Virol.* **75:** 9339–9344.

Mangeot P.E., Duperrier K., Nègre D., Boson B., Rigal D., Cosset F.L., and Darlix J.L. 2002. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther.* **5:** 283–290.

Mangeot P.E., Nègre D., Dubois B., Winter A.J., Leissner P., Mehtali M., Kaiserlian D., Cosset F.L., and Darlix J.L. 2000. Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells. *J. Virol.* **74:** 8307–8315.

Marandin A., Dubart A., Pflumio F., Cosset F.L., Cordette V., Chapel-Fernandes S., Coulombel L., Vainchenker W., and Louache F. 1998. Retroviral-mediated gene transfer into human $CD34^+/38^-$ primitive cells capable of reconstituting long-term cultures in vitro and in nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice in vivo. *Hum. Gene Ther.* **9:** 1497–1511.

Mochizuki H., Schwartz J.P., Tanaka K., Brady R.O., and Reiser J. 1998. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* **72:** 8873–8883.

Movassagh M., Desmyter C., Baillou C., Chapel-Fernandes S., Guigon M., Klatzmann D., and Lemoine F.M. 1998. High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum. Gene Ther.* **9:** 225–234.

Nakajima T., Nakamaru K., Ido E., Terao K., Hayami M., and Hasegawa M. 2000. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum. Gene Ther.* **11:** 1863–1874.

Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Nègre D., Duisit G., Mangeot P.E., Moullier P., Darlix J.L., and Cosset F.L. 2002. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261:** 53–74.

Nègre D., Mangeot P., Duisit G., Blanchard S., Vidalain P.O., Leissner P., Winter A.J., Rabourdin-Combe C., Mehtali M., Moullier P., Darlix J.L., and Cosset F.L. 2000. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.* **7:** 1613–1623.

Patience C., Takeuchi Y., Cosset F.L., and Weiss R.A. 1998. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J. Virol.* **72:** 2671–2676.

Peng K.W., Pham L., Ye H., Zufferey R., Trono D., Cosset F.L., and Russell S.J. 2001. Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Ther.* **8:** 1456–1463.

Porter C.D., Collins M.K.L., Tailor C.S., Parkar M.H., Cosset F.L., Weiss R.A., and Takeuchi Y. 1996. Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Hum. Gene Ther.* **7:** 913–919.

Ruprecht R. 1999. Live attenuated AIDS viruses as vaccines: Promise or peril? *Immunol. Rev.* **170:** 135–149.

Salmon P., Nègre D., Trono D., and Cosset F.-L. 2000. A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1

vectors. *J. Gene Med.* (suppl.) **2:** 23.
Sandrin V., Boson B., Salmon P., Gay W., Nègre D., Le Grand R., Trono D., and Cosset F.L. 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates. *Blood* **100:** 823–832.
Schneider R., Campbell M., Nasioulas G., Felber B.K., and Pavlakis G.N. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* **71:** 4892–4903.
Schnell T., Foley P., Wirth M., Munch J., and Uberla K. 2000. Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* **11:** 439–447.
Seganti L., Superti F., Girmenia C., Melucci L., and Orsi N. 1986. Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica* **9:** 259–267.
Stitz J., Buchholz C., Engelstadter M., Uckert W., Bloemer U., Schmitt I., and Cichutek K. 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273:** 16–20.
Stitz J., Muhlebach M.D., Blömer U., Scherr M., Selbert M., Wehner P., Steidl S., Schmitt I., Konig R., Schweizer M., Cichutek K. 2001. A novel lentivirus vector derived from apathogenic simian immunodeficiency virus. *Virology* **291:** 191–197.
Swanstrom R. and Wills J.W. 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. *Retroviruses* (ed. J.M. Coffin et al.), pp. 263–334. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
Wagner R., Graf M., Bieler K., Wolf H., Grunwald T., Foley P., and Uberla K. 2000. Rev-independent expression of synthetic *gag-pol* genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: Implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **11:** 2403–2413.
Zufferey R., Donello J.E., Trono D., and Hope T.J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73:** 2886–2892.

# 第六章　基于猫免疫缺陷病毒的慢病毒载体的生产和使用

Dyana T. Saenz, Román Barraza, Nils Loewen, Wulin Teo 和 Eric M. Poeschla
Molecular Medicine Program, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota 55905
郭维锐　译



## 摘要

基于猫免疫缺陷病毒（FIV）的慢病毒载体对于介导整合的转基因到非分裂的人体细胞是非常有用的。本章主要描述了生产和使用新一代 FIV 载体的方法，讨论了 FIV 和其他慢病毒载体相比较的关键特征，并提供了大规模/小规模载体生产的详细方案。此外，最近鉴定的种属特异的反转录病毒限制因素的实际应用和非整合的 FIV 载体的生成也是本章讨论的主题。

## 引言

慢病毒载体最初起源于致病的人免疫缺陷病毒 1（HIV-1）（Parolin and Sodroski 1995）。随着新型的包膜假型的研究，改进的重组 HIV-1 包装结构和转运载体（Burns et al. 1993）导致了决定性地证明基于 HIV-1 的载体能在体内和体外转导非分裂的细

胞，并且能达到具有基因治疗前景的水平（Naldini et al. 1996）。其后，基于非灵长类慢病毒的载体系统被迅速设计出来，而基于猫免疫缺陷病毒（FIV）的载体被证实可以转导非分裂的人类细胞如人原代神经细胞和巨噬细胞（Poeschla et al. 1998）。FIV 载体能有效地转导在脑、眼、呼吸道、造血系统、肝脏、肌肉和胰腺中的细胞（Poeschla et al. 1998；Johnston et al. 1999；Wang et al. 1999；Alisky et al. 2000；Curran et al. 2000，2002；Loewen et al. 2001，2002，2003a，b；Stein et al. 2001；Brooks et al. 2002；Curran and Nolan 2002a，b；Derksen et al. 2002；Hughes et al. 2002；Haskell et al. 2003；Sinn et al. 2003；Saenz and Poeschla 2004）。它们在移植的人体器官中也具有很好的效果（Wang et al. 1999；Loewen et al. 2001，2002）。

FIV 和其他的基于非灵长类慢病毒的载体在人类基因治疗方面拥有生物安全的优势，因为 FIV 在人体中并不能繁殖，不会引起人类疾病，更不会引起和 HIV 血清的交叉反应。改造 FIV 的尝试已经成为人类接触的一种广泛的自然流行病学，在各种慢病毒中是独一无二的。FIV 在家猫种群中是广泛流行的，而它致使的免疫缺陷类似于 HIV-1 在人体中的作用。通过在猫间的传输和撕咬这样有说服力的方法表明，使用 FIV 治疗人类疾病已经被广泛地推断为有效的方法（Pederson 1993）。不仅如此，在人体中也不会观察到疾病、病毒复制或者是血清反应。第二就是对患者和其他人员来说，慢病毒包含大量的包膜和其他病毒蛋白质，它们经常呈现为假型使之在进入细胞步骤的时候能扩大感染效力和宿主范围。在这个方面，FIV 不与 HIV-1 产生交叉感染（Pederson 1993；Elder and Phillips 1995）。因此在治疗应用或者是无意的个体接触的时候不会产生 HIV-1 特异的免疫反应。尽管 HIV-1 载体在研究的条件下是安全的，我们的经验表明在那些并不是针对病毒学或者是基因治疗研究的试验室中，许多人仍旧情愿使用复制缺陷的 HIV-1 系统，并且更加容易接受非灵长类的系统。最后，在 HIV-1 感染的个体中，通过复制 HIV-1 来拯救 FIV 转运载体基因组的现象并未发生。

## 转染后的限制：非灵长类慢病毒载体潜在的优点和缺点

使用非人类慢病毒进行基因治疗自然会引起一些关于载体在人体组织的取向和效率的实际应用问题。一个很重要的问题就是与 HIV 载体相比较的相对较小的效率。如上所述，尽管用 FIV 治疗人类疾病取得了较好的实践结果，但到目前为止，通过基于一个特殊的标准模型，对于各种不同的慢病毒的直接比较，也只取得了少量可靠的科学数据。近期的精力用于瞄准种属特异的后续限制模式（如 Ref1 和 Lv1），在这个方面对于马传染性贫血病毒（EIAV）和 FIV 已经更加清楚。最近，对于发现和总结三重基序蛋白 TRIM5α 的特点的研究已经热到极点，因为这个蛋白质负责 Lv1 的限制活性（Stremlau et al. 2004）。Ref1，人们起初知道它的活性是它能限制人体细胞中的 EIAV 和北半球热带鼠白血病病毒（N-MLV）的活性，而且它是由人 TRIM5α 来调节的。和这些载体一样，FIV 载体在一些人细胞中也呈现 Ref1 限制的形态，如在反转录发生之前或者是同时发生时，以一种饱和的形式被限制酶酶切（Saenz et al. 2005）。限制酶酶切的程度大致与 EIAV 载体相当，并且表现的形式是由灵长类 TRIM5α 蛋白来控制的（Saenz et al. 2005）。

应该强调的是非灵长类慢病毒载体和初级慢病毒载体仅仅在一些人类靶细胞中表现

出后续限制的现象，这个必须由经验来判断。另外，这个类型的转染后限制对于特殊的基因治疗既可以是合意的又可以是不合意的，这点不是人们可以控制的。FIV 对初级限制因子易感的特征和对于基因治疗的影响，可以见 Saenz（2005）的讨论。简单地说，只有当颗粒的输入量很低的时候，Ref1/人 TRIM5α 介导的转染后限制才显得很重要。当细胞感染了大量的病毒或者是载体的时候，或者是共感染其他的限制性反转录病毒或者类病毒颗粒（VLP）的时候，细胞中的 TRIM5α 才会被饱和，限制反应也就会被抵消。这个限制反应的输入依赖的滴度仅仅需要共转染的颗粒具有进入的能力并且包含那些限制型反转录病毒的成熟包膜；它们既不需要包含 RNA 基因组，也不需要通过相同的受体途径进入细胞（Besnier et al. 2002，2003；Towers et al. 2002；Hatziioannou et al. 2003；Berthoux et al. 2004；Saenz et al. 2005）。在许多基因治疗的应用中，没有 VLP 的病毒颗粒输入导致局部的浓度要远高于饱和 Ref1/TRIM5α 活性所需要的浓度。在这种情况下，或者如果靶组织几乎不表达 TRIM5α，Ref1 限制反应也许能提供一种绝对优势：作为一个强力的先天屏障去阻止复制活性反转录病毒（PCR）的系统性繁殖。限制反应可以通过添加 VLP 如 FIV 或者是其他的限制性反转录病毒如 N-MLV 来克服。FIV 包膜是否能够被组装逃脱人类 TRIM5α 的相互作用仍旧不清楚，但是这种行为的代价将会是失去经受得住进化考验的系统性 RCR 屏障。

一旦感染经历了细胞膜的阶段，转染后的限制开始发生，FIV 前整合复合物就可以高效地整合到人体细胞中（Saenz et al. 2005）。当前病毒整合到细胞中以后，另一个阻止人体细胞中的野生型病毒发挥功能的途径开始发挥作用，这个要比转染后的限制更加厉害。在人体细胞中，FIV 长末端重复序列（LTR）事实上不起始转录（Poeschla and Looney 1998；Poeschla et al. 1998）。不过，在这种情况下，对于标准的慢病毒转基因来说，由于这个阻滞效应能够减轻插入突变效应并干扰内源启动子，因此从基因治疗的角度来说，转录失活的阻滞效应是十分必要的。这个阻滞效应诱发了对转运载体所需要的人宿主细胞如 293T 细胞中繁殖的阻碍效应。用一个异源的启动子替代 5′U3 可以有效地起始载体繁殖（Poeschla and Looney 1998；Poeschla et al. 1998）。

## 优化载体组分

我们已经充分地修订和优化了论证过的 FIV 载体系统（综述见 Loewen et al. 2003a）。载体和包装元件之间存在着微小的重叠区域。对于包装结构来说，额外的顺式作用非编码序列和蛋白质编码序列都被剔除掉了（图 1）。我们也在 FIV 基因组的 mRNA中系统地标注出包装相关决定子的位置（Kemler et al. 2002，2004），除了 *gag* 可读框的一小段之外，其余都已经从包装结构中移除了。包装结构 pFP93（用 9 个核苷酸的规范的供体序列取代）不含有病毒引导序列 *vif* 和 U3 序列。少量的残余 *env* 序列分布在 Rev 反应元件两侧（图 1）。病毒序列在 *rev* 终止密码子的 3′端终止。就像美洲旱獭肝炎病毒转录后调节序列（WPRE）那样，由中间的多嘌呤位点（cPPT）和中部终止子序列（CTS）组成（Whitwam et al. 2001）的中部 DNA 折板被嵌入到转运载体中（Donello et al. 1998；Zufferey et al. 1999）。内部核糖体进入位点（IRES）允许标记基因（*neoR*、*gfp*）和相关基因共表达（图 1）。通过流式细胞分选（FACS）可以用于富集含有荧光标记的转导细胞。选择性基因标记（如嘌呤霉素、潮霉素和新霉素）也

可以被用于筛选细胞。这两个类型的基因均可以用于检测载体滴度。

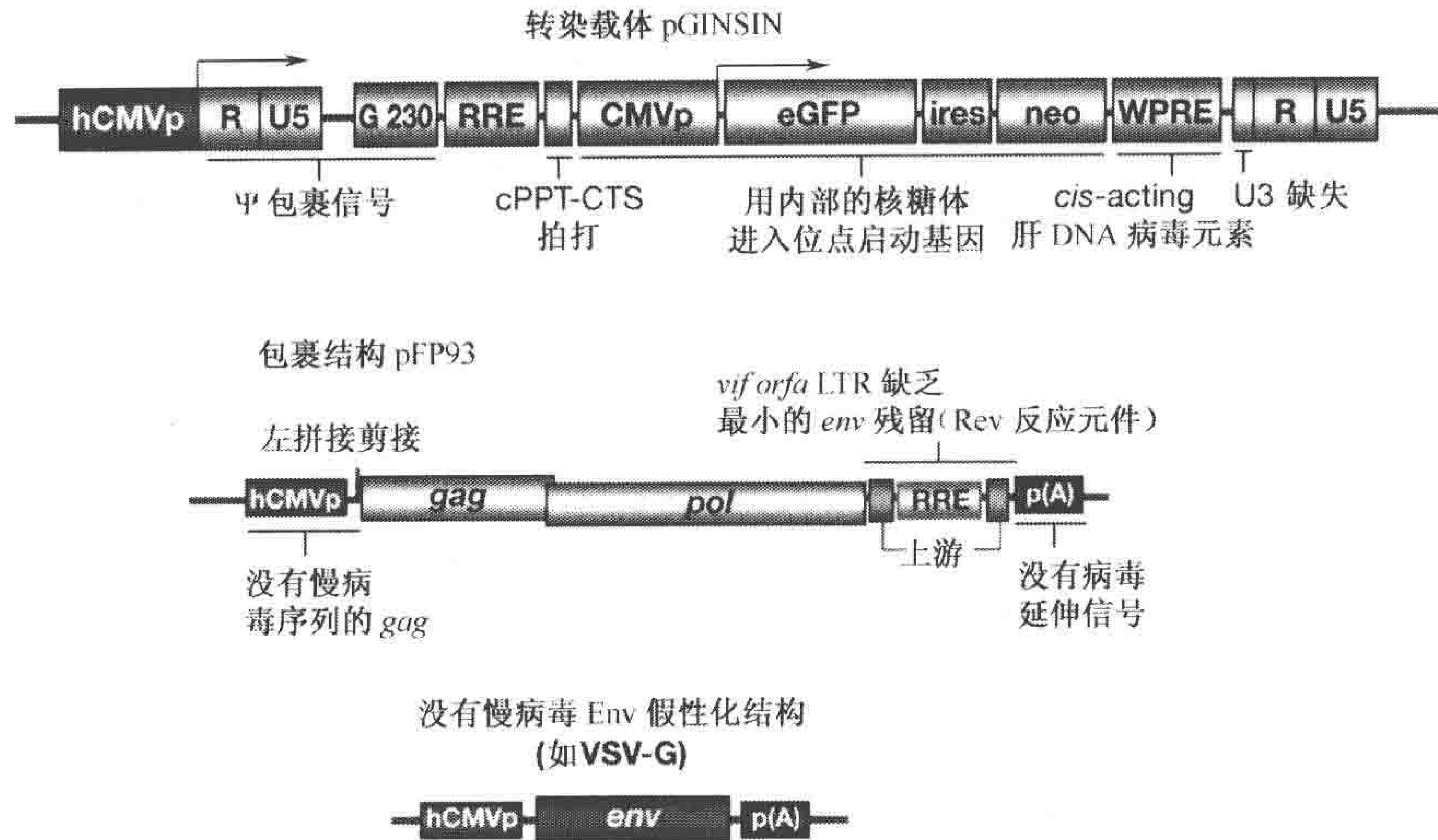



图 1. 三组分 FIV 慢病毒载体系统图表。FIV 转运载体 pGINSIN:(Ψ)壳体包装信号;(G230)只给出了 *gag* 5'端 230bp 的长度。WORE 使 RNA 具稳定性。U3 丢失了中心的 167 个核苷。(pFP93)装配结构。各种各样的病毒包膜蛋白被用来作为假模标本。

上面描述的 FIV LTR 在绝大部分人细胞中的转录沉默也给 FIV 载体提供了一个一流的自我失活(SIN)特性。通过删除 3'U3 元件中部的 167 个核苷酸,我们创造了一个传统的 SIN 载体来根除 LTR 介导的插入突变;虽然保留了两侧的 25 个和 24 个核苷酸序列,但是主要的转录因子结合位点和 TAT 框被删除了。本章的质粒名称都是通常使用的载体构造派生出来的。pFP93 是一个微型的 FIV 包装质粒,编码 Gag、Gag/Pol 前体和 Rev 蛋白。pGINSIN 载体是一个含有 U3 缺失的 SIN 载体。它编码一个绿色荧光蛋白,该蛋白质通过 IRES 和新霉素磷酸转移酶(*neoR*)的单顺反子相连。另一个可供选择的载体是β牛乳糖载体 pCT26。pMD. G 是一个包膜假型结构,它能表达棒状病毒疱疹性口炎病毒(VSV-G)的包膜糖蛋白。其他的包膜糖蛋白也可能表达,如双嗜性载体包膜、长臂猿白血病病毒包膜或者是丝状病毒糖蛋白。非棒状病毒的包膜的稳定程度较低,可以通过蔗糖垫或者是其他方法来提高浓度。对这些质粒尤其是转运载体的进一步的反复和增进修饰版本均在使用,并且可以通过合适的方式替代。我们还没有追求优化 FIV *gag/pol* 的编码,尽管消除另一个病毒基因,能获得一种绝对的载体安全性的优点或缺点(Hope 2002),然而我们仍不清楚这种方法是否会影响 *gag/pol* mRNA的自由输出以及对 Rev 需求的稳定性。

## 载体生产的常用信息

应用鼠致癌反转录病毒载体的安全性是可以控制的。FIV 载体可以在生物安全等级 2 级的环境中操作。由于通过任意一种反转录病毒载体转导主要的癌基因都需要严格的条件(一般是 3 级,指导手册见 Richmond and McKinney 1999),转基因识别也是相应的。基于优化条件依赖于我们要用的转基因,所有的载体工作都需要经过当地的生物安

全委员会的批准。尽管到目前为止没有任何有关慢病毒载体引发 RCR 的报道，我们仍需要记住这个自然引发 RCR 的极低的可能性的存在。在基础科研材料中检验它们的存在的例行检查是不能和在临床条件下的材料中确认它们存在的检验相提并论的。

下列材料使用一个现在通用的术语来表达，转染是指用物理方法导入质粒 DNA，转导是指通过复制缺陷的病毒载体进行基因转运，感染是被能复制的病毒感染。磷酸钙共沉淀转染法是将质粒 DNA 导入 293T 细胞产生 FIV 载体的一个有效方法。通过这个方法可以高效地感染这种细胞。不过，对优化特殊试剂的条件的要求比较苛刻，尤其是 2×HBS 的 pH，对于产生高浓度的慢病毒载体保存液是很重要的。例如，病毒滴度与 293T 宿主细胞的百分转染率有算术上的相关性。但是，病毒滴度的 log 值差异可以用宿主细胞的转染效率的差别来计算。转染的问题试剂和设备的微小的差异相关，甚至特异的塑料皿的类型都会影响转染。一个运转良好的试验方案按比例扩大后也许需要重新优化；10cm 的皿或者是 $75cm^2$ 的培养瓶，需要用 10～15ml 载体上清，能够满足小量的载体生产。下列方案描述了如何用 1000ml（CF10）或者是 200ml（CF2）体积在多层细胞培养设备（Nunc）中进行大规模载体生产的方法。这些设备是非常适合大体积的生产的。一个 CF10 提供的面积比 80 个 $75cm^2$ 培养瓶还大。用 6 个 220ml 的桶离心可以得到 10～400 倍浓度的病毒。如果需要可以进行第二次离心。

一些生产慢病毒载体的方案指定需要相关大量的高质量的质粒 DNA（每 $75cm^2$ 单层转染细胞需 35～70$\mu$g）。我们发现减少 DNA 的输入会导致相同的结果（应用 QIAGEN大提试剂盒来提取 DNA）。一般来说，大约 7$\mu$g 总 DNA 就可以产生相同的大量病毒。因此可以考虑减少个人的时间和材料的花费。293 胚胎肾细胞（HEK），是 293T 细胞的前体，可能起源于稀有的神经前体细胞系，它可经过变形的 DNA 腺病毒类 5 型转染人胚胎肾培养物后转化而成（Shaw et al. 2002）。293T 细胞是 293 细胞发展出来的，它可以表达猴病毒 40（SV40）大 T 抗原，允许 T 抗原驱动的质粒复制。一般情况下，转染是在傍晚完成，因为需要在 6～18h 后更换培养基，对于 VSV-G 假型来说最合适的时间是 12～16h（Burns et al. 1993）。本章的关于大规模和小规模生长载体的方案都是用于基础科研的体外试验的，它们不必满足临床生产（GMP）的标准。

## 方案 1

# 用生长在 CF10 或者是 CF2 设备中的细胞生产载体

这个方案描述了用生长在 CF10 或者是 CF2 设备中的细胞生产 FIV 慢病毒载体的方法。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

转染细胞系：293T

早期的 293T 细胞比较好。它们可以在种植转染前持续均一地分裂。

DMEM 加 10%胎牛血清（DMEM-10）、100μ/ml 青霉素<!>、100μg/ml 链霉素<!>以及 2mmol/L L-谷氨酸

质粒 DNA：pMD.G、pFP93、pGINSIN

对于体外转染，质粒 DNA 应该是无菌的且不含内毒素。商业试剂盒如去除内毒素的质粒大提试剂盒（QIAGEN 2362）是可以信赖的。氯化铯纯化的方法也可以。

转染试剂

Tris-HCl<!>（10mmol/L，pH 8.0）用于稀释质粒 DNA

$CaCl_2$（2.5mol/L）<!>

高压灭菌然后保存在−20℃

2×HEPES 缓冲盐水（HBS）

保存液——$Na_2HPO_4$<!>：52.5g $Na_2HPO_4$、5000ml $H_2O$。2×HBS：80g NaCl、65g HEPES（钠盐）、100ml $Na_2HPO_4$ 保存液。小心优化 pH 是非常重要的。用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 到一系列的设定好的范围很窄的点，如 pH6.95、7、7.05 等。调节终体积到 5000ml。最佳的 pH6.95 可供选择。但是最终使用储存液完全由转染效率的经验来决定。冻存（−20℃）。pH 随着时间变化，因此可以得到不同转染百分比。每隔 3～6 个月需要重新配制。通过转染表达 GFP 的质粒可以发现最佳的转染试剂可以转染 95%的 293T 细胞。可以将转染试剂冷藏或者冻存，但重要的是在转染的时候使用转染试剂时应该在室温的条件下进行。

胰酶-EDTA（细胞培养级别）<!>

## 设备

吸气瓶（2L Kimax）（Kimble Glass 14607-2000）或者是类似的吸气设备

烧杯（1L，与所用的培养基体积一样大小）

培养瓶（无菌塑料瓶；CF2：250ml，CF10：1000ml）

用硅管和连接器连接培养瓶（无菌）的细胞工厂

漏斗（无菌）

培养箱，预设到 37℃、5% $CO_2$（架子应该精确调整到适合细胞工厂）

显微镜

CF2 工厂培养的细胞可以用绝大部分组织培养显微镜观察。对于 CF10 细胞工厂来说，需要用 Nikon Eclipse TE300 或者类似的显微镜观察。

Nunc 细胞工厂（1 层 CF1、2 层 CF2、10 层 CF10 或者 40 层 CF40）

Nunc 细胞工厂启动试剂盒（170769）带有 HDPE 连接器（171838）、封盖（171897）、蓝色密封盖（167652）和 Gelman 4210 细菌空气通风过滤膜。

有能透过空气盖子的组织培养瓶（175$cm^2$；T175）

## 方法

1. 准备细胞和转染

**对于 CF10 设备**

a. 转染前 3 天，接种 6 瓶 T175，每瓶含有 $6\times10^6$ 个 293T 细胞，培养 48h。

b. 转染前一天，用胰酶消化 T175 细胞，接种 $2.5\times10^8$ 个 293T 细胞到 CF10 中。

**对于 CF2 设备**

a. 转染前三天，接种 2～3 瓶 T175，每瓶含有 $1\times10^7$ 个 293T 细胞，培养 48h。

b. 转染前一天，用胰酶消化 T175 细胞，接种 $5\times10^7$ 个 293T 细胞到 CF2 中。

2. 以 1∶3∶3 的比例加入 3 种质粒（pMD. G、pFP93、pGINSIN）。

对于 CF10：混合 84.5/253.5/253.5μg 质粒到一个 250ml 的无菌瓶中。用 10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）调节到 60.5ml 的体积，加入 6.5ml 2.5mmol/L $CaCl_2$，然后在密闭的瓶中旋转混匀。

对于 CF2：混合 16.9/50.7/50.7μg 质粒到一个 250ml 的无菌瓶中。用 10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）调节到 60.5ml 的体积，加入 6.5ml 2.5mol/L $CaCl_2$，然后在密闭的瓶中旋转混匀。

3. 倾斜设备把瓶里面的液体倒掉，然后加入 67ml（CF10）或者是 13.4ml（CF2）2×HBS。
4. 立即轻轻倒转瓶子 4～6 次混匀（最好是旋转）。沉淀 DNA 3～5min。
5. 把 DNA-$Ca_2PO_4$ 混合物转移到另一个容器中，停止沉淀。

对于 CF10：转移到 800ml 的新鲜培养基中，放到一个 1000ml 的无菌塑料有盖的瓶中。这个瓶子可以和一个过滤单元一起使用。

对于 CF2：转移到 185ml 的新鲜培养基中，放到一个 250ml 的无菌塑料有盖的瓶中。

6. 如下更换培养基：

a. 把细胞工厂的培养基倒入到一个脏的烧杯中，弃掉。

b. 将无菌的硅管相连漏斗，然后接到细胞工厂。

c. 将细胞工厂放到一边使得打开的通风口对于工作外层关闭。

d. 提高漏斗，缓慢地将转染混合物和新鲜培养基倒入到漏斗中。确保能均匀分散到每个隔间。

e. 举起连接/通风管末端的细胞工厂，使得培养基流过打开的通风管口，从而阻止上层隔间的培养基漏到下层。

f. 把细胞工厂准确地水平摆放到培养箱架子上（细胞可以刚好被转染混合物覆盖）。

7. 培养细胞 16～18h，用显微镜观察组织培养的外层。一个较好的 DNA-羟磷灰石沉淀（比细胞小很多的黑色斑点）应该呈现在细胞的表面。
8. 如下更换培养基：

a. 把细胞工厂的培养基倒入到一个脏的烧杯中，弃掉。

b. 将无菌的硅管相连漏斗然后接到细胞工厂，然后把细胞工厂放到一边。

c. 提高漏斗，缓慢地将 1000ml（CF10）或者是 200ml（CF2）新鲜培养基倒入到漏斗中。确保能均匀分散到每个隔间。

d. 举起连接/通风管末端的细胞工厂，使得培养基如步骤 6 一样流过打开的通风管口。

e. 把细胞工厂准确地水平摆放到培养箱架子上。

## 方案 2

# 用生长在 CF10 或者是 CF2 设备中的细胞收获和浓缩载体

这个方案描述了用生长在 CF10 或者是 CF2 设备中的细胞收获和浓缩载体的方法。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

漂白水（10%）<!>
乙醇（70%溶于组织培养级别的双蒸水中，分子级）
磷酸盐缓冲液（PBS，组培级）
蔗糖（20%），20mmol/L Tris<!>（pH7.4），100mmol/L NaCl 溶液
用 0.45μm 或者 0.2μm 滤膜过滤。

### 设备

高压灭菌锅
培养瓶（250ml 带螺旋盖的塑料瓶）（如 Corning 聚苯乙烯培养瓶、430281）
细胞滤网（如 BD Falcon、70μm 尼龙、352350）
带旋盖的冷冻管（1.0～1.8ml，无菌，Nunc）
过滤设备（1000ml，0.22μm 孔径大小）（如 Nalgene MF75 系列）
微型离心管（1.5ml 和 0.5ml，无菌）
微型移液器
带刻度的平衡离心管
超速离心机（Sorvall Discovery 100SE，Beckman L8-80M，或者相等设备）
超速离心瓶（250ml）：异质同晶聚合物超速离心管，Oakridge（Sorvall 54477）带碳氟化合物盖子（Sorvall 54421）和 A612 转头（Sorvall 119977）或者相等设备。
超速离心管（36ml）：可任意使用的异质同晶聚合物超速离心管（Sorvall 03141）用于 SureSpin630 转头（Sorvall 79367）或者是 SW28 转头（Beckman 342207）；12ml 同质异晶聚合物超速离心管（Sorvall 03699）用于 TH641 转头（Sorvall 08224）或者是 SW41Ti 转头（Beckman 341302）。

## 方法

1. 在更换转染细胞培养基之后 48h，用一个大的无菌容器收集上清。低速离心几分钟去除细胞残渣。

其他可用的方法，如用3～5min将分离的细胞沉入到瓶底。细胞工厂可以在组织培养架中用高压双蒸水清洗两次然后密封保存到4℃重复使用。

2. 把上清倒入到一个50μm的细胞过滤器来澄清上清。然后用0.22μm的滤器过滤。一个1000ml的Nalgene设备足够装600～800ml载体。一个500ml的Nalgene设备在堵塞之前足够装300～400ml载体。将过滤好的载体上清等均分出一小份（约2ml）到冷冻管中，用于后面的滴度和复苏对照。储存到－80℃。

   VSV-G假型的FIV载体在高点的温度下短期可以保持非常稳定，37℃，24h或者是4℃，72h仍有一半的活力。

3. 用70％乙醇清洗要使用的合适转头。
4. 如下离心载体上清：

   **对于CF10**

   a. 用70％乙醇清洗250ml同质异晶聚合物Oakridge超速离心瓶的里面和碳氟化合物盖子。吹干。

      A621转头使用可重复利用的超速离心瓶和白色的盖子。这些瓶子不能高压；应该用10％漂白液灭菌。

   b. 加200ml过滤好的载体上清到每个250ml超速离心瓶中。过滤后，载体上清的总体积将少于1L。用PBS调整最后一瓶的体积到200ml。紧紧盖上盖子。

      如果这些管子或者是瓶子不满的话，在超速离心的过程中可能会出现部分崩溃的现象。用平衡臂将这些管子连同盖子一起平衡。

   c. 在Sorvall Discovery 100SE超速离心机（67 000 $g_{rmax}$）中使用A612转头19 000r/min离心，或者是相等设备，4℃下离心6h。

   d. 将上清倒掉，把250ml的瓶子以45°角斜着放在冰上，载体颗粒朝向下。吸去和载体颗粒方向相反的预冷的液体。然后，将载体颗粒旋转向下，加6～7ml PBS到设定好的第二次的浓度。否则，可以加入适当少量体积的PBS。

   e. 沿着载体颗粒那一面用吸管加入PBS开始重悬。首先直接清洗管的全长，用液体直接流向颗粒。这一步对每瓶需要大约5min。将所有的物质加入到一个250ml的瓶子中开始第二次超速离心。

      35～40ml重悬载体上清到6个瓶子中。一些第一次浓缩的载体可以等分（如800μl）到小管并冻存到－80℃用于后面的滴度和复苏比较。第一次的浓度复苏时保留50％～80％的转导单位。

   f. 对于第二次的浓度，用纳米纯水清洗可反复使用的12ml同质异晶聚合物超速离心管的里面以去除用于包装的可以和载体颗粒吸附和共纯化的纸纤维。高压灭菌并冷却到室温备用。

      管子是不可重复使用的。超速离心将塑料变薄，如果第二次使用，管子将会泄漏。

   g. 用70％乙醇清洗SW 41 Ti转头的桶和盖子，吹干。加入9ml第一次浓缩的重悬的载体和1ml 20％的蔗糖溶液到12ml同质异晶聚合物超速离心管中。如果有必要加入PBS填满管子大盘最大体积（10ml），平衡拧紧。

      建议这一步先加5ml重悬载体到超速离心管中，然后将1ml蔗糖溶液直接加入到管的底部，然后再在总体积的上部加入4ml重悬载体。这个技术可以确保在恢复的载体和蔗糖溶液之间形成一个合适的界面。

h. 在 Sorvall Discovery 100SE 超速离心机中用 SW41 Ti 转头或者相等设备 4℃下 24 000r/min（瓶的底部是 67 000 $g_{rmax}$，而瓶的顶部是 31 000 $g_{rmin}$）离心 1.5h。将可以重新看见颗粒。

i. 用 100μl PBS 重悬并清洗管的底部 5min。可以先将微量移液器调整到 100μl 的体积。将枪头保持在液面下以免产生气泡。重悬的液体呈乳白色并带有轻微的黏性。将重悬的载体加入到一个 1.5ml 的微型离心管中，3000$g$ 离心 3min 以去除没有悬起的物质。

第二次的浓度复苏时和原有的未浓缩的上清相比保留 30%～70%的转导单位。有些复苏可以达到 100%，这可以反映出在原始的上清中的聚集的转染单位的分散程度。

j. 将载体颗粒等分到合适的体积（如 50μl 或者 100μl）冻存到－80℃。

k. 用 70%乙醇清洗 A621 转头去除可能泄漏出来的载体上清。保存到 4℃。

**对于 CF2**

a. 用纳米纯水清洗新的 36ml 一次性 polyallomer 超速离心管的内部，以消除纤维纸板。不会冲走任何与载体颗粒相连的任何碎片。高压灭菌管子，让它们自行冷却至室温后再使用。

管子是不可重复使用的。超速离心将塑料变薄，如果第二次使用，管子将会泄漏。

b. 每个 36ml 管子中加入 25ml 载体上清。缓慢吸取 5ml 20%的蔗糖溶液加入到载体上清的下面。然后加 2.5～3ml 载体上清到最大体积。

c. 在 Sorvall Discovery 100SE 超速离心机（67 000 $g_{rmax}$）中使用 SW 28 转头19 000r/min 离心，或者是相等设备，4℃下离心 1.5h。这时看不见颗粒。

d. 吸去管中的上清并保留一小部分体积。用 PBS 或者是其他预设的培养基重悬。加 100μl PBS 或者培养基到每个管中。用微量移液器清洗管壁。在重悬前用枪头沿着管的底部清洗。这一步对每个管需要约 5min。将所有的上清收集到一个管中。目标是收集 1～2ml 重悬的载体。将载体颗粒等分到合适的体积（如 50μl）－80℃冻存。

第一次的浓度复苏时保留 50%～80%的转导单位。

e. 用 70%的乙醇清洗桶以去除可能泄漏出来的载体上清。把转头和桶保存到 4℃。

## 方案 3

# 用生长在 T75 细胞培养瓶中的细胞生产和收集载体

这个方案描述了用生长在 T75 细胞培养瓶中的细胞生产和收集载体的方法。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

转染细胞系：293T

早期的 293T 细胞比较好。它们可以在种植转染前持续均一地分裂。

DMEM 加 10%胎牛血清（DMEM-10）、100U/ml 青霉素＜!＞、100μg/ml 链霉素＜!＞以及 2mmol/L L-谷氨酸

质粒 DNA：pMD. G、pFP93、pGINSIN

转染试剂

Tris-HCl＜!＞（10mmol/L，pH 8.0）用于稀释质粒 DNA

$CaCl_2$（2.5mol/L）＜!＞

高压灭菌然后保存在－20℃。

2×HEPES 缓冲盐水（HBS）

见方案 1 中的成分。

## 设备

过滤设备（0.22μm，50ml；Nalgene）

具备可以透过空气的细胞培养瓶（$75cm^2$，T75）

管子（5ml 干净的聚苯乙烯管，如 Falcon 352058）

涡旋混合器用于混合 Falcon 管子中的转染复合物

## 方法

1. 转染前两天，将细胞培养基调整到可以转染的状态。转染前一天，接种 $3\times10^6$ 个细胞到每个细胞培养瓶，生长过夜培养。
2. 转染前 4h，用 10ml 新鲜培养基更换生长培养基。
3. 调整 3 种质粒 DNA（pMD. G、pFP93、pGINSIN）的比例为 1∶3∶3，加入 1.0μg pMD. G、3.0μg pFP93、3.0μg pGINSIN 到一个无菌的 5.0ml 的 Falcon 管中。用 10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）调整体积到 800μl。
4. 用一个适中的速度边旋转边加入 800μl 2.5mol/L $CaCl_2$，然后让 $CaCl_2$ 沉淀 3mol/L。将会呈现出一片模糊的乳白色。
5. 吸取混合物直接加入到一个倾斜的 T75 培养瓶的底部的培养基中，如此细胞单层就不会脱落。轻轻晃动使沉淀均匀分散到细胞单层中而不撞动细胞。
6. 培养 16～18h。然后，更换培养基，用枪吸，轻轻吸取移除培养基，更换成 10～15ml 新鲜培养基。小心不要扰乱细胞单层。
7. 继续培养 48h。收集上清离心并用 0.22μm 滤膜过滤。
8. 等份分到冻存管中冻存到－80℃。

## 方案 4

# 滴定

这个方案描述了测量和用 TU/ml 计算病毒滴度的方法。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞系或者是用于滴定的细胞系：HT1080、HeLa、RD、Crandell feline kidney（CrFK）细胞、293T、canine D17 或者是 NIH-3T3

悬浮细胞液可以用于 GFP 载体。

适合各种细胞的培养基

福尔马林（1%）（选用，见步骤 5）＜!＞

戊二醛（1%）＜!＞

X-gal 染色液＜!＞

准备 10×缓冲液：50mmol/L 铁氰化钾＜!＞、50mmol/L 亚铁氰化钾＜!＞、50mmol/L $MgCl_2$＜!＞水溶液。

准备 40×X-gal 储存液：40mg/ml X-gal＜!＞溶解于 DMSO＜!＞。

终溶液是用 PBS 稀释成 1×缓冲液和 1mg/ml X-gal。等分成小份冻存到－80℃。

磷酸盐缓冲液（PBS，细胞培养级别）

载体储存液

### 设备

流式细胞分选仪（FACS）

显微镜

细胞培养板（6 孔或 24 孔）

细胞计数仪

## 方法

1. 接种 $2.5\times10^5$ 个/孔到 6 孔板中。培养过夜。
2. 冻融载体储存液，依照载体浓度制备 4～10 倍的系列稀释液。高倍数的稀释液用于高滴度。这些液可以在 24 孔板中进行。参照各个不同的细胞系，接种 $4\times10^4$～$6\times10^4$ 个/孔。对于 6 孔板，接种 $2.5\times10^5$ 个/孔。彻底混合，每步更换枪头避免遗留物。

   对于未浓缩的载体，使用 $10^{-1}$～$10^3$ 范围的稀释倍数；对于单次的浓缩载体，使用 $10^2$～$10^5$ 范围的稀释倍数；对于两次浓缩的载体，使用 $10^2$～$10^5$ 范围的稀释倍数。感染 2～3 次。
3. 吸去细胞培养基把混合物加入到各个孔中，每次更换枪头或者是从高浓度到低浓度。至少留下一个孔不转导作为对照。

   聚凝胺（8μg/ml）可以增加转导效率到 10 倍左右，但是在体外使用的时候有一定的毒性，不适合体内应用。我们要避免在滴定的时候使用它。通过精确设定滴定的条件（细胞系、

密度、聚凝胺等）来提高滴定操作。

4. 6h 以后，更换成新鲜培养基。放回到培养箱中。

5. 测定滴度。

**对于 GFP 载体**

a. 48h 后，收集细胞（贴壁细胞用胰酶消化），用 PBS 清洗，重悬。

b. 用溶解于 PBS 的 1%福尔马林固定细胞从而稳定荧光便于后面的细胞分选，或者是保存在 4℃而不固定，24h 之内进行分析。

c. 用流式测定转导效率。选择 5%～30%GFP 表达增强细胞作为最值得参考的计算滴度的孔。

超过 30%的转导细胞的孔中会包含一些明显的多转导细胞片段。用转导时的细胞数量来计算滴度要比接种细胞的时候的细胞更加准确。我们估计 CrEK 细胞生长在含 10%FCS 的 DMEM 培养基中分裂一代的时间需要 18～24h。对于 1ml/孔的转导体积来说，计算滴度的公式是转导时的细胞数量×FACS 的百分比 阳性细胞数目×稀释因子＝TU/ml。计算2～3 个孔的平均值和标准偏差。

人的 CMV 启动子 48h 内在许多细胞中能得到大量的基因表达。其他的启动子（如 PGK 和 EF1α）在某些细胞如 T 细胞中可以使 GFP 更好地表达。不同的启动子 细胞系的组合将需要更多的时间和转基因产品来估算峰值。

**对于 β-半乳糖苷酶载体**

a. 48h 后，用 β-戊二醛室温固定细胞 3min，用 PBS 清洗。

b. 用 X-gal 染色液 37℃孵育过夜。用 PBS 洗一次，更换 PBS 或者是干燥平板。

c. 用 100×放大倍数观察计算 10 个任意正方形内的阳性转基因灶的数目，以此来计算每个孔的阳性克隆的数目。

透明计数格便于计数。对于 1ml 的体积，计算滴度的公式是每孔 β-半乳糖苷酶阳性克隆的总数×稀释因子＝TU/ml。计算 2～3 个孔的平均值和标准偏差。

滴度计算也可以使用选择标记如 *neoR*（G418）。用抗生素筛选到所需要的时候之后再计算克隆数目。可以用免疫荧光来探测转基因灶等转基因产品。另外，可以通过 IRES 来把感兴趣的蛋白质标记基因直接连接到一起。通过对反转录酶的活性标准分析和壳蛋白的 ELISA（酶联免疫吸附剂测定）分析不能精确计算表示替代滴度，因为感染效率只是和这些参数近似相关。

## 可供选择的方案：整合酶变异载体

反转录病毒整合酶（ IN ）中的蛋白质催化中心的某些残基的突变可以选择性废除整合酶的催化活性（ D64、D116 和 HIV-1 IN 中的 E152)。这些“I 类突变”对 FIV IN 的作用最近又得到了验证（Saenz et al. 2004)。其他突变，展示的“二类”表型，即更多的影响是显而易见的。这种区别很重要，因为通过蛋白酶介导的剪切可以从 Gag/Pol 前体得到许多 IN。通常，在生命周期的其他各个部分中的微妙缺陷是由二类突变引起的。IN 中的缺失，如许多单氨基酸的突变，能在病毒上产生各种突变。I 类 IN 突变起初用于检验整合载体 DNA（如不是来源于假型转导）在体内转基因表达的对照（Naldini et al. 1996)。在病毒颗粒同样的去激活那些整合酶内部具有适当的较低的摩尔成分

的一个或者两个氨基酸的载体的时候，使用具有单个（D66V）或者是双个（D66V，D116A）I类突变的 FIV 包装构造允许精确控制的载体对照（Naldini et al. 1996；Loewen et al. 2003b；Saenz et al. 2004）。这使得允许确切的功能研究和其他的整合酶终点的直接检测，如一个或者是两个 LTR 回路。

尽管如此，人们把越来越多兴趣开始放在 I 类 IN 突变在基因治疗的潜在应用之中（Lu et al. 2004；Saenz et al. 2004；Vargas et al. 2004）。一个潜在用途是在非周期的细胞中，那里无论是线性的或者是环状的 DNA，都不能被整合，可以被转录（Wu and Marsh 2001；Saenz et al. 2004）。在组织培养中，I 类突变的慢病毒载体和野生型的载体的表达含量一样丰富，使得内部启动子得到使用并且细胞生长得到抑制（Saenz et al. 2004）。这种载体可能有用的第二种情况是不仅非分裂细胞是它的靶细胞，而且可以提供转基因的瞬时表达。用定制的锌指蛋白核酸酶修复基因就是这样的一个顺式转染需要蛋白质的例子（Urnov et al. 2005）。为了准备这些载体，这里描述的准备方案，除了使用 pFP 93. D66V 或者是 pFP 93. D66V ＋D 116A 来代替包装质粒 pFP 93 之外，所有其他方面都保持不变。

## 参考文献


Alisky J.M., Hughes S.M., Sauter S.L., Jolly D., Dubensky T.W., Jr., Staber P.D., Chiorini J.A., and Davidson B.L. 2000. Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport* **11:** 2669–2673.

Berthoux L., Sebastian S., Sokolskaja E., and Luban J. 2004. Lv1 inhibition of human immunodeficiency virus type 1 is counteracted by factors that stimulate synthesis or nuclear translocation of viral cDNA. *J. Virol.* **78:** 11739–11750.

Besnier C., Takeuchi Y., and Towers G. 2002. Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 11920–11925.

Besnier C., Ylinen L., Strange B., Lister A., Takeuchi Y., Goff S.P., and Towers G.J. 2003. Characterization of murine leukemia virus restriction in mammals. *J. Virol.* **77:** 13403–13406.

Brooks A.I., Stein C.S., Hughes S.M., Heth J., McCray P.M., Jr., Sauter S.L., Johnston J.C., Cory-Slechta D.A., Federoff H.J., and Davidson B.L. 2002. Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 6216–6221.

Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8033–8037.

Curran M.A. and Nolan G.P. 2002a. Nonprimate lentiviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261:** 75–105.

———. 2002b. Recombinant feline immunodeficiency virus vectors. Preparation and use. *Methods Mol. Med.* **69:** 335–350.

Curran M.A., Kaiser S.M., Achacoso P.L., and Nolan G.P. 2000. Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol. Ther.* **1:** 31–38.

Curran M.A., Ochoa M.S., Molano R.D., Pileggi A., Inverardi L., Kenyon N.S., Nolan G.P., Ricordi C., and Fenjves E.S. 2002. Efficient transduction of pancreatic islets by feline immunodeficiency virus vectors. *Transplantation* **74:** 299–306.

Derksen T.A., Sauter S.L., and Davidson B.L. 2002. Feline immunodeficiency virus vectors. Gene transfer to mouse retina following intravitreal injection. *J. Gene Med.* **4:** 463–469.

Donello J.E., Loeb J.E., and Hope T.J. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J. Virol.* **72:** 5085–5092.

DuBridge R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., and Calos M.P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7:** 379–387.

Elder J.H. and Phillips T.R. 1995. Feline immunodeficiency virus as a model for development of molecular approaches to intervention strategies against lentivirus infections. *Adv. Virus Res.* **45:** 225–247.

Haskell R.E., Hughes S.M., Chiorini J.A., Alisky J.M., and Davidson B.L. 2003. Viral-mediated delivery of the late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene, TPP-I to the mouse central nervous system. *Gene Ther.* **10:** 34–42.

Hatziioannou T., Cowan S., Goff S.P., Bieniasz P.D., and Towers G.J. 2003. Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *EMBO J.* **22:** 385–394.

Hope T. 2002. Improving the post-transcriptional aspects of lentiviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261:** 179–189.

Hughes S.M., Moussavi-Harami F., Sauter S.L., and Davidson B.L. 2002. Viral-mediated gene transfer to mouse primary neural progenitor cells. *Mol. Ther.* **5:** 16–24.

Johnston J.C., Gasmi M., Lim L.E., Elder J.H., Yee J.K., Jolly D.J., Campbell K.P., Davidson B.L., and Sauter S.L. 1999. Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J. Virol.* **73:** 4991–5000.

Kang Y., Stein C.S., Heth J.A., Sinn P.L., Penisten A.K., Staber P.D., Ratliff K.L., Shen H., Barker C.K., Martins I., Sharkey C.M., Sanders D.A., McCray P.B., Jr., and Davidson B.L. 2002. In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. *J. Virol.* **76:** 9378–9388.

Kemler I., Azmi I., and Poeschla E.M. 2004. The critical role of proximal *gag* sequences in feline immunodeficiency virus genome encapsidation. *Virology* **327:** 111–120.

Kemler I., Barraza R., and Poeschla E.M. 2002. Mapping of the encapsidation determinants of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76:** 11889–11903.

Loewen N., Barraza R., Whitwam T., Saenz D., Kemler I., and Poeschla E. 2003a. FIV vectors. *Methods Mol. Biol.* **229:** 251–271.

Loewen N., Fautsch M., Peretz M., Bahler C., Cameron J.D., Johnson D.H., and Poeschla E.M. 2001. Genetic modification of human trabecular meshwork with lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **12:** 2109–2119.

Loewen N., Leske D., Chen Y., Teo W., Saenz D., Peretz M., Holmes J., and Poeschla E.M. 2003b. Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pig-

ment epithelium. *J. Gene Med.* **5:** 1009–1017.

Loewen N., Bahler C., Teo W., Whitwam T., Peretz M., Xu R., Fautsch M., Johnson D.H., and Poeschla E.M. 2002. Preservation of aqueous outflow facility after second-generation FIV vector-mediated expression of marker genes in anterior segments of human eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43:** 3686–3690.

Lotery A.J., Derksen T.A., Russell S.R., Mullins R.F., Sauter S., Affatigato L.M., Stone E.M., and Davidson B.L. 2002. Gene transfer to the nonhuman primate retina with recombinant feline immunodeficiency virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **13:** 689–696.

Lu R., Nakajima N., Hofmann W., Benkirane M., Jeang K.T., Sodroski J., and Engelman A. 2004. Simian virus 40-based replication of catalytically inactive human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants in nonpermissive T cells and monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* **78:** 658–668.

Naldini L., Bloemer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Parolin C. and Sodroski J. 1995. A defective HIV-1 vector for gene transfer to human lymphocytes. *J. Mol. Med.* **73:** 279–288.

Pedersen N.C. 1993. The feline immunodeficiency virus. In *The Retroviridae* (ed. J.A. Levy), pp. 181–228. Plenum Press, New York.

Poeschla E. and Looney D. 1998. CXCR4 is required by a non-primate lentivirus: Heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent and feline cells. *J. Virol.* **72:** 6858–6866.

Poeschla E., Wong-Staal F., and Looney D. 1998. Efficient transduction of nondividing cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* **4:** 354–357.

Price M.A., Case S.S., Carbonaro D.A., Yu X.J., Petersen D., Sabo K.M., Curran M.A., Engel B.C., Margarian H., Abkowitz J.L., Nolan G.P., Kohn D.B., and Crooks G.M. 2002. Expression from second-generation feline immunodeficiency virus vectors is impaired in human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **6:** 645–652.

Richmond Y.S. and McKinney R.W., eds. 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMCL)*, 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service & Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Saenz D.T. and Poeschla E.M. 2004. FIV: From lentivirus to lentivector. *J. Gene Med.* (suppl. 1) **16:** S95–104.

Saenz D., Teo I., Olsen J.C., and Poeschla E. 2005. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, LV1 and primate TRIM5α proteins. *J. Virol.* **79:** 15175–15188.

Saenz D., Loewen N., Peretz M., Whitwam T., Barraza R., Howell K., Holmes J.H., Good M., and Poeschla E.M. 2004. Unintegrated lentiviral DNA persistence and accessibility to expression in nondividing cells: Analysis with class I integrase mutants. *J. Virol.* **78:** 2906–2920.

Shaw G., Morse S., Ararat M., and Graham F.L. 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16:** 869–871.

Sinn P.L., Hickey M.A., Staber P.D., Dylla D.E., Jeffers S.A., Davidson B.L., Sanders D.A., and McCray P.B., Jr. 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J. Virol.* **77:** 5902–5910.

Stein C.S. and Davidson B.L. 2002. Gene transfer to the brain using feline immunodeficiency virus-based lentivirus vectors. *Methods Enzymol.* **346:** 433–454.

Stein C.S., Kang Y., Sauter S.L., Townsend K., Staber P., Derksen T.A., Martins I., Qian J., Davidson B.L., and McCray P.B., Jr. 2001. In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **3:** 850–856.

Stremlau M., Owens C.M., Perron M.J., Kiessling M., Autissier P., and Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427:** 848–853.

Towers G., Collins M., and Takeuchi Y. 2002. Abrogation of Ref1 retrovirus restriction in human cells. *J. Virol.* **76:** 2548–2550.

Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., and Holmes M.C. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435:** 646–651.

Vargas J., Jr., Gusella G.L., Najfeld V., Klotman M.E., and Cara A. 2004. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **15:** 361–72.

Wang G., Slepushkin V., Zabner J., Keshavjee S., Johnston J.C., Sauter S.L., Jolly D.J., Dubensky T.W., Jr., Davidson B.L., and McCray P.B., Jr. 1999. Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect (see comments). *J. Clin. Invest.* **104:** R55–62.

Whitwam T., Peretz M., and Poeschla E.M. 2001. Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **75:** 9407–9414.

Wu Y. and Marsh J.W. 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293:** 1503–1506.

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., and Hope T.J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73:** 2886–2892.

# 第七章 造血细胞的慢病毒转导

Ming-Jie Li 和 John J. Rossi

Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California 91010

姜 琳 译



## 摘要

在转基因技术中，高效转染和转基因的持续表达是最重要的问题。大多数造血细胞，包括造血干细胞和终末分化细胞，如初生 T 细胞和巨噬细胞，是不分化或自我更新缓慢的。对于这些细胞，大多数非病毒或反转录病毒转染方法是不可行的。慢病毒载体适用于转染未分化的细胞以及长效维持转基因的表达。带有各种基因的慢病毒载体已成功转染许多造血细胞。慢病毒载体可用于许多转载操作，如短发夹 RNA（shRNA）和功能基因的长效表达。它们在基因治疗方面也将有很大的潜力。

## 引言

基因转移的主要问题之一即需要一个运输体系来确保基因的高效转导和表达。来自鼠白血病病毒的反转录载体，由于其能够高效地整合到靶细胞基因组，故长期以来被基因转移和人类基因治疗操作所钟爱（Miller et al. 1990；Verma 1994；Leiden 1995）。但是这类载体高效的基因转移是需要细胞分裂的，而正是这一点限制了它们在非增殖细胞中的应用，如造血干细胞（Miller et al. 1990）。相反，来自于人类免疫缺陷病毒 1（HIV-1）的慢病毒载体能够转导静止的细胞型，并维持转基因的长效表达（Naldini et al. 1996a，b；Blomer et al. 1997；Kafri et al. 1997）。据报道，一个单一的慢病毒载体可以在造血干细胞中高效地转移和表达三个聚合酶 III（pol III）表达盒以及一个聚合酶 II 介导的报道基因（Li et al. 2005）。

利用 pHIV7-GFP（绿色荧光蛋白）为原型，典型的第三代自我灭活（SIN）载体及其产生机制如图 1 所示。质粒 pCgp 包含 *gag/pol* 基因，它们产生结构蛋白和反转录

酶。pCMV-*rev* 编码 Rev，它结合 Rev 反应元件（RRE），使来自细胞核的 RNA 高效运输。pCMV-G 编码水泡性口炎病毒 G 蛋白（VSV-G），来替代 HIV1 Env。VSV-G 扩展载体的嗜性，并可通过超速离心进行浓缩。转运载体 pHIV7-GFP 中 5′LTR（长末端重复序列）端的 U3 区域，被巨细胞病毒的启动子和增强子序列所代替。此包装信号（ψ）对于病毒的包装很重要，而 RRE 则是生产高滴度载体所必需的。此序列对于载体 DNA 的核运输极为重要，是转导不分化细胞所必需的（Sirven et al. 2000）。增强的 GFP 报道基因（EGFP）用于载体的浓缩、转导效率的测定以及转导细胞的筛选。EGFP 序列之后是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件（WPRE）（Zufferey et al. 1999），用于提高报道基因的表达。在 3′LTR，顺式调控序列完全被 U3 区域所替代。

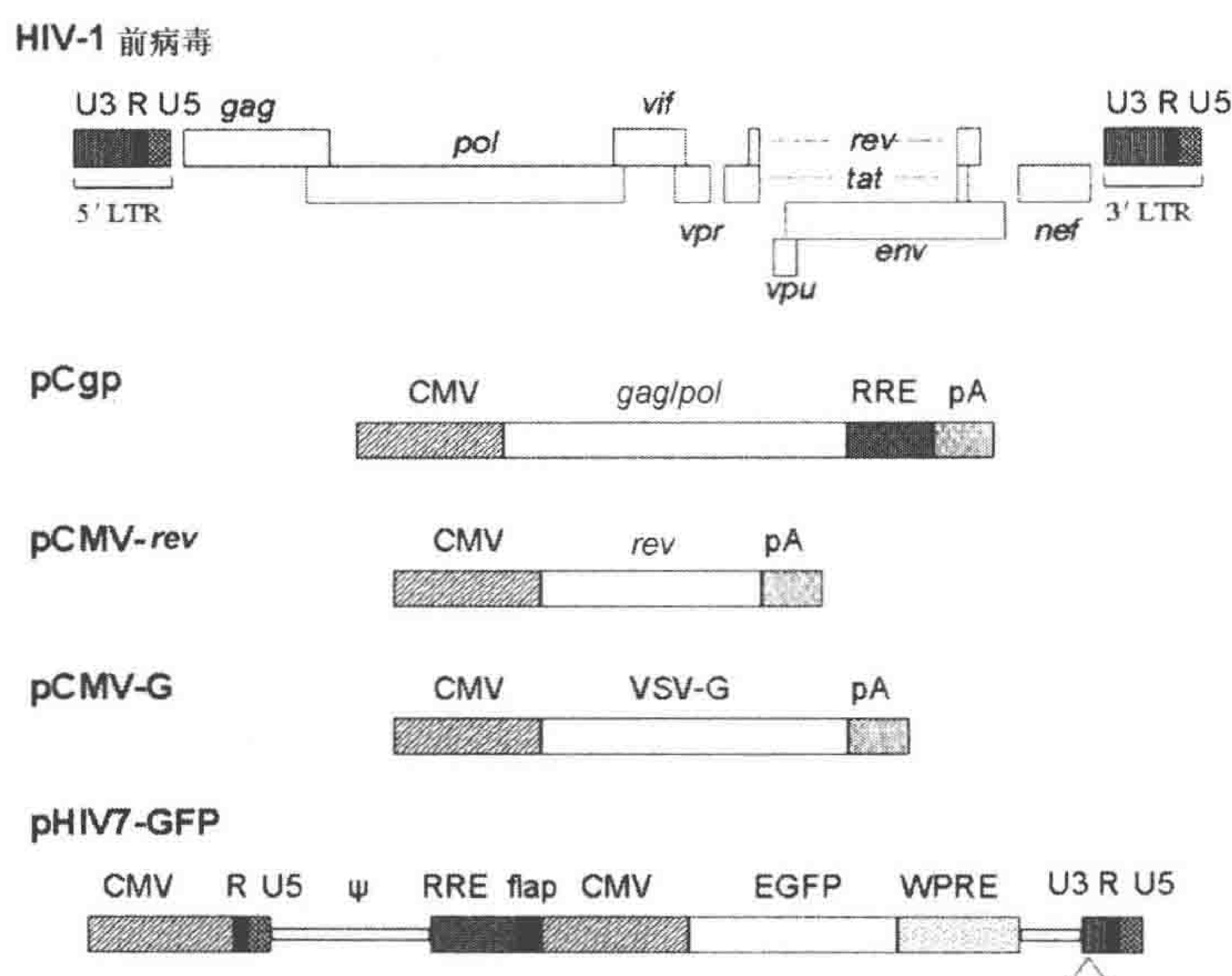



图 1. HIV-1 前病毒，源于 HIV-1 的慢病毒载体以及包装质粒示意图。用于生成载体的元件被分成 4 个不同的质粒。pCgp 包含 *gag* 和 *pol* 基因，源自 HIV-1 的 RRE 序列位于 CMV 启动子的控制之下。pCMV-*rev* 包含 *rev* 编码序列，亦由 CMV 启动子操控。pHIV7-GFP 转移载体包含一个杂合的 5′LTR，其中的 U3 区被 CMV 启动子、包装信号（ψ）、RRE 序列、侧翼序列、由 CMV 启动子控制的 EGFP 基因和 WPRE 所替代；其 3′LTR 中的顺式调控序列则完全被 U3 区替代。目的基因可以被克隆到转移载体位于 EGFP 的 CMV 启动子上游的多位点接头中。pA 表示来自人类 β-珠蛋白基因的多聚腺苷酸信号。

包装转移载体形成转染微粒，需要共转染以上四种质粒到合适的宿主细胞中。磷酸钙转染方法对于质粒转染 293T 细胞是廉价且高效的。载体产生期间培养基中含有丁酸钠可以使慢病毒载体的滴度增强 10 倍（Gasmi et al. 1999）。超速离心浓缩可以进一步增大滴度。

Polybrene（聚凝胺）已被广泛用于基因转移操作。有报道在一些细胞类型中，低速离心也可增强转导效率（Zielske and Gerson 2002）。RetroNectin，一个重组的人类纤连蛋白片段 CH-296，已广泛用于 $CD34^+$ 造血细胞的转导（Hanenberg et al. 1997）。

慢病毒载体甚至不需要细胞分裂而能进入细胞核，细胞因子的刺激可以显著增强其在造血干细胞中的转导效率（Zielske and Gerson 2003）。

## 方案

# 慢病毒载体转染造血细胞

此方法描述了采用慢病毒载体转运外源基因到造血细胞，适用于实验中的各种细胞类型转基因的长效表达。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

抗 CD34 抗体结合的磁珠（若转导早期造血干细胞；Miltenyi Biotec Inc.）

牛血清白蛋白（BSA；PBS 中 2%）

于 100ml PBS 中溶解 2g BSA（片段 V）。通过 0.2μm 滤器过滤。4℃保存。

$CaCl_2$（2mol/L）<!>

溶解 29.4g $CaCl_2$（J. T. Baker）于 70ml 水中。补水至 100ml。0.2μm 滤器过滤。

细胞

293T（含 SV40 大 T 抗原的人类胚肾细胞）

HT1080（人成纤维肉瘤细胞系）

被转导的细胞（靶细胞）

甲醛（3.7%在 PBS 中）<!>

用 PBS 以 1∶10 比例稀释 37%甲醛溶液（Sigma-Aldrich）。

2× HEPES 缓冲液（HBS；0.05mol/L HEPES、0.28mol/L NaCl，以及 1.5mmol/L $Na_2HPO_4$，pH 7.12）

于 200ml 水中溶解 2.38g HEPES、3.28g NaCl、42.6mg $Na_2HPO_4$。0.2μm 滤器过滤。

293T 和 HT1080 细胞培养基

含 10%胎牛血清（FBS）的高糖（4500mg/L）DMEM 培养基，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素<!>。

靶细胞培养基

根据细胞类型和实验设计选择合适的培养基，细胞因子和其他营养成分。如在此法中，所用的 $CD34^+$ 转导培养基为：IMDM，含 20% BIT9500（干细胞技术，Vancouver，B. C. Canada）、100ng/ml 干细胞因子（SCF）、100ng/ml Flt3-lig，以及 100ng/ml 促血小板生成素（TPO）。

磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）

137mmol/L NaCl

2.7mmol/L KCl

8.1mmol/L $Na_2HPO_4$<!>

1.5mmol/L $KH_2PO_4$ <!>

质粒 DNA

此法的质粒 DNA，即含目的转基因的 pHIV-GFP、pCgp、pCMV-*rev*、pCMV-G。依据操作说明用 QIAGEN 质粒试剂盒纯化所有的质粒 DNA。

聚凝胺（4mg/ml）

溶解 40mg 聚凝胺（hexadimethrine bromide）于 10ml 水中。0.2μm 滤器过滤。4℃保存。

RetroNectin（Takara Mirus Bio Inc.，Madison，Wisconsin）

依据操作说明制备 25μg/ml RetroNectin。4℃保存。

TE 79/10

用水以 1∶10 比例稀释 TE79（10mmol/L Tris-HCl 和 1mmol/L EDTA，pH 7.9）。0.2μm 滤器过滤。

## 仪器

离心管（1×3.5in polyallomer [Beckman]）

用前高压灭菌（15psi，15～20min）。

荧光激活细胞分离器（FACS）

孵箱（37℃）

非组织培养处理平板（48 孔和 24 孔）

培养板（12 孔）

注射器（30ml）

针头式过滤器（0.2μm）

细胞培养皿（10mm）

超速离心机和 SW28 转头（Beckman）

## 方法

### 慢病毒载体的生成：载体的包装

1. 293T 细胞在完全培养基，37℃烘箱，5% $CO_2$ 中生长。转染前 24h，将指数生长的 293T 细胞以 $4\times10^6$ 个/平板的密度接种于 100mm 培养皿中。

   转染时细胞密度约为 80%。

2. 每 100mm 平板细胞制备 1ml 磷酸钙-DNA 悬液，方法如下：

   a. 为每个转染平板准备两个无菌管，标记为管 1 和管 2。

   b. 向管 1 中加入 0.5ml 2×HBS。

   c. 向管 2 中加入 TE 79/10。TE 79/10 的体积等于 440μl 减去 DNA 溶液的体积。

   d. 向管 2 中加入 15μg 含转基因的转移载体，15μg pCgp、5μg pCMV-*rev* 以及 5μg pCMV-G，混匀。

   e. 向管 2 中加 60μl 2mol/L $CaCl_2$，混匀。

   f. 将管 2 中的液体逐滴地加入管 1 中并轻微混匀。

   g. 室温孵育 30min。

3. 吸打或漩涡混合沉淀。
4. 向含有细胞的 100mm 平板中加 1ml 悬液。缓慢滴加并轻柔晃动培养基。将平板放回 37℃孵箱孵育 4h 并弃去沉淀。
5. 用 6ml 新鲜培养基替换旧培养基。加 60μl 0.6mol/L 丁酸钠。孵箱孵育。
6. 48h 后，收集上清，−80℃冻存，或进行浓缩步骤。

## 载体的浓缩

7. 900*g* 离心 10min 上清（新鲜收集或从冰箱中解冻）以去除细胞碎片。
8. 0.2μm 针头滤器过滤上清。
9. 将上清转移到高压灭菌的离心管中。4℃，Beckman SW28 转头，24 500r/min 下超速离心 1.5h 以浓缩上清液。
10. 弃去上清，将沉淀以适量的培养基重悬，例如，若需要 100 倍浓缩，则对应 30ml 原始溶液需加 300μl 培养基。
11. 以 10～15μl 分装浓缩后的载体，−80℃保存。

## 载体的滴度测定

12. 以 $5\times10^4$ 个/孔接种于 12 孔板，完全培养基，37℃孵箱，5%$CO_2$ 培养过夜。
13. 向细胞中加入各个稀释梯度的载体以及 4μl/ml 聚凝胺。继续培养 48h。
14. 消化细胞。离心，弃上清，用 300μl 含 3.7%甲醛的 PBS 重悬细胞。
15. FACS 分析 EGFP 阳性细胞的百分率。

滴度以每毫升浓缩载体的转染单位（TU）表示，即 TU/ml。

$$滴度=\frac{细胞数\times EGFP阳性细胞的百分数\times 稀释度}{载体体积（ml）\times 100}$$

## 慢病毒载体转染靶细胞

**用于转染培养的造血细胞**

16. 在 24 孔板中用 1ml 培养基以 $2\times10^5$ 个细胞/孔接种指数生长的细胞。
17. 根据细胞类型的不同加入不同体积的浓缩载体。对于 K562 细胞系（CML 白血病细胞系）来说，感染指数（moi）为 10 时可以达到 100%的转导率。
18. 加 4μg/ml 聚凝胺。细胞于 37℃孵育。
19. 孵育过夜后，将细胞离心，弃上清并用新鲜培养基重悬，再培养。
20. 转染 48h 后，由 FACS 分析计算转染效率（见疑难解答）。

**转染早期造血干细胞**

21. 依操作流程，利用结合抗 $CD34^+$ 抗体的免疫磁珠从脐带血或骨髓中分离纯化 $CD34^+$ 造血干细胞。
22. 转染前 48h，在 $CD34^+$ 转染培养基中培养 $CD34^+$ 细胞。
23. 用 0.2ml 25μg/ml RetroNectin（约 5μg/$cm^2$）包被 48 孔培养板，室温下 2h。
24. 弃去 RetroNectin，然后添加 0.2ml 含 2%BSA 的 PBS 封闭。室温下 30min。
25. 用 PBS 清洗培养板后，用普通的 IMDM 培养基调整慢病毒载体至合适的感染指数

（范围 5～40），终体积 200μl，加入已包被的平板中。

26. 37℃孵育 2h 后，弃去载体上清，用 PBS 清洗培养板。
27. 以 $1\times10^5$ 个/孔的密度，0.2ml 生长培养基将预刺激的 $CD34^+$ 细胞加入孔中，37℃孵育。
28. 过夜培养后，将细胞离心，以 1ml 培养基重悬，并转移细胞至 24 孔板，孵箱孵育。
29. 转染 6d 后，FACS 分析转染效率。

## 疑难解答

问题（步骤 20）：一些细胞类型，如 CEM（一种人类 T 细胞系），用标准的流程很难转导。

解决方法：对于此类用正常方法抗转染的细胞，离心可以充分地增强转染效率。用如下方法处理此类细胞：将含 $2\times10^5$ 个的 1ml 培养基和载体以及 4μg/ml 聚凝胺混合于 15ml 离心管中。20℃下 900$g$ 离心 30min。然后，不弃去上清，用吸管重悬细胞并转移到培养皿中。孵育细胞过夜，替换培养基继续培养。

## 致谢

感谢 Dr. Jiing-Kaun Yee 提供 pHIV7-GFP 和包装质粒。笔者被国家研究所健康基金 AI29329，AI42552 和 HL074704 所支持。

## 参 考 文 献

Blomer U., Naldini L., Kafri T., Trono D., Verma I.M., and Gage F.H. 1997. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* **71:** 6641–6649.

Gasmi M., Glynn J., Jin M.J., Jolly D.J., Yee J.K., and Chen S.T. 1999. Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J. Virol.* **73:** 1828–1834.

Hanenberg H., Hashino K., Konishi H., Hock R.A., Kato I., and Williams D.A. 1997. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human $CD34^+$ hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2193–2206.

Kafri T., Blomer U., Peterson D.A., Gage F.H., and Verma I.M. 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.* **17:** 314–317.

Leiden J.M. 1995. Gene therapy—Promise, pitfalls, and prognosis. *N. Engl. J. Med.* **333:** 871–873.

Li M.-J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J.-K., Anderson J., Akkina R., and Rossi J.J. 2005. Long term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme and a nucleolar localizing TAR decoy. *Mol. Ther.* **12:** 900–909.

Miller D.G., Adam M.A., and Miller A.D. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* **10:** 4239–4242.

Naldini L., Blomer U., Gage F.H., Trono D., and Verma I.M. 1996a. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11382–11388.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996b. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Sirven A., Pflumio F., Zennou V., Titeux M., Vainchenker W., Coulombel L., Dubart-Kupperschmitt A., and Charneau P. 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* **96:** 4103–4110.

Verma I.M. 1994. Gene therapy: Hopes, hypes, and hurdles. *Mol. Med.* **1:** 2–3.

Zielske S.P. and Gerson S.L. 2002. Lentiviral transduction of P140K MGMT into human $CD34^+$ hematopoietic progenitors at low multiplicity of infection confers significant resistance to BG/BCNU and allows selection in vitro. *Mol. Ther.* **5:** 381–387.

———. 2003. Cytokines, including stem cell factor alone, enhance lentiviral transduction in nondividing human LTCIC and NOD/SCID repopulating cells. *Mol. Ther.* **7:** 325–333.

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., and Hope T.J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73:** 2886–2892.

# 第八章　基于脾坏死病毒的载体

Zahida Parveen,[*] Muhammad Mukhtar[*] 和 Roger J. Pomerantz[†]

[*] The Dorrance H. Hamilton Laboratories, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107;[†] Tibotec Inc., Yardley, Pennsylvania 19067

姜　琳　译



## 摘要

基因工程构建的反转录病毒已被广泛用于人类细胞的基因转移。许多研究者已研究用脾坏死病毒（SNV）作为基因转移的载体。我们已采用由SNV以及与其紧密相关的禽类网状内皮增殖症病毒A（REV-A）发展的载体在许多细胞中实现了基因转移，包括其他各种载体系统都难于转导的早期造血细胞，人类脑以及有丝分裂后期的神经元细胞。基于SNV的载体系统具有非常安全的优点，因为野生型的SNV不能感染人类细胞，并且整合进转录激活位点或基因中的可能性较小。反转录病毒载体的生成需要一个或更多的质粒共转染进一个包裹的细胞系中，这将是一个漫长的过程。发展表达结构蛋白Gag-Pol和包被（Env）蛋白的稳定包裹细胞系，将为未来体内或体外的基因治疗实验提高反转录病毒载体的产量。

## 引言

基因工程构建的反转录病毒是基因转运到人类细胞的最常用的工具（Dornburg 1995; Dornburg and Pomerantz 2000; Kim et al. 2000; Kurian et al. 2000; Palu et al. 2000）。在过去的几十年中，用于基因转移的许多反转录病毒载体被发展并应用到临床实验。对于各种用于人类细胞转基因的载体系统的争论一直是研究的热点。基于SNV的载体已证明可靶向人类细胞并高效地转移基因（Dougherty and Temin 1987; Dornburg 1995, 2003; White and Gilmore 1996; Martinez and Dornburg 1995b; Par-

veen et al. 2000，2003；Acheampong et al. 2005；Marusich et al. 2005)。此载体系统很安全，因为野生型 SNV 不能感染人类细胞，且不易于整合入转录活跃的位点或基因中(Gautier et al. 2000；Mitchell et al. 2004)。

近来，反转录病毒载体由组织培养皿或瓶中单层培养的包裹细胞系产生。它们以微粒的形式产生，具有特殊的半衰期，并能应答各种刺激。反转录病毒载体为基因向各种分裂细胞及静止细胞的转移提供了机会。

这一章描述的实验方法是基于我们关于来自 SNV 及其紧密相连的 REV-A 载体的实验（Parveen et al. 2000)。我们曾用这两种病毒载体对各种细胞进行基因转移，包括初期的造血细胞、人脑及有丝分裂后的神经元细胞（Parveen et al. 2000)。与其他反转录病毒载体相同，基于 SNV 载体系统的三个主要元件是：①包装信号序列（ψ)，以确保载体 RNA 壳体化进入反转录微粒；②反转录机制；③整合前病毒载体进入宿主细胞的必需序列（Kurian et al. 2000；Dornburg 2003)。为了加强病毒微粒的治疗潜能，病毒的生命周期被遗传改造，即这些微粒在转染时只能转移一个治疗性基因而不能进一步复制。这个已通过从分离的质粒中表达各种病毒形态发生的必需元件完成（Naldini et al. 1996；Naldini 1999；Naldini and Verma 2000；Ailles and Naldini 2002)。所以，如图 1 所示，对于反转录病毒微粒的生成，共转染多于一个质粒进入包被的细胞系是必需的。共转染多个质粒是一个复杂的过程，它包含了质粒 DNA 比例的优化（Mukhtar et al. 2000)。为了解决这个难题，我们致力于表达结构蛋白 Gag-Pol 和包被（Env）蛋白的稳定细胞系生成的研究（Martinez and Dornburg 1995a)。这将大大增加用于体内或体外基因治疗实验的反转录病毒的产量。表 1 给出了常用的 SNV 载体和包被细胞系的详细列表。

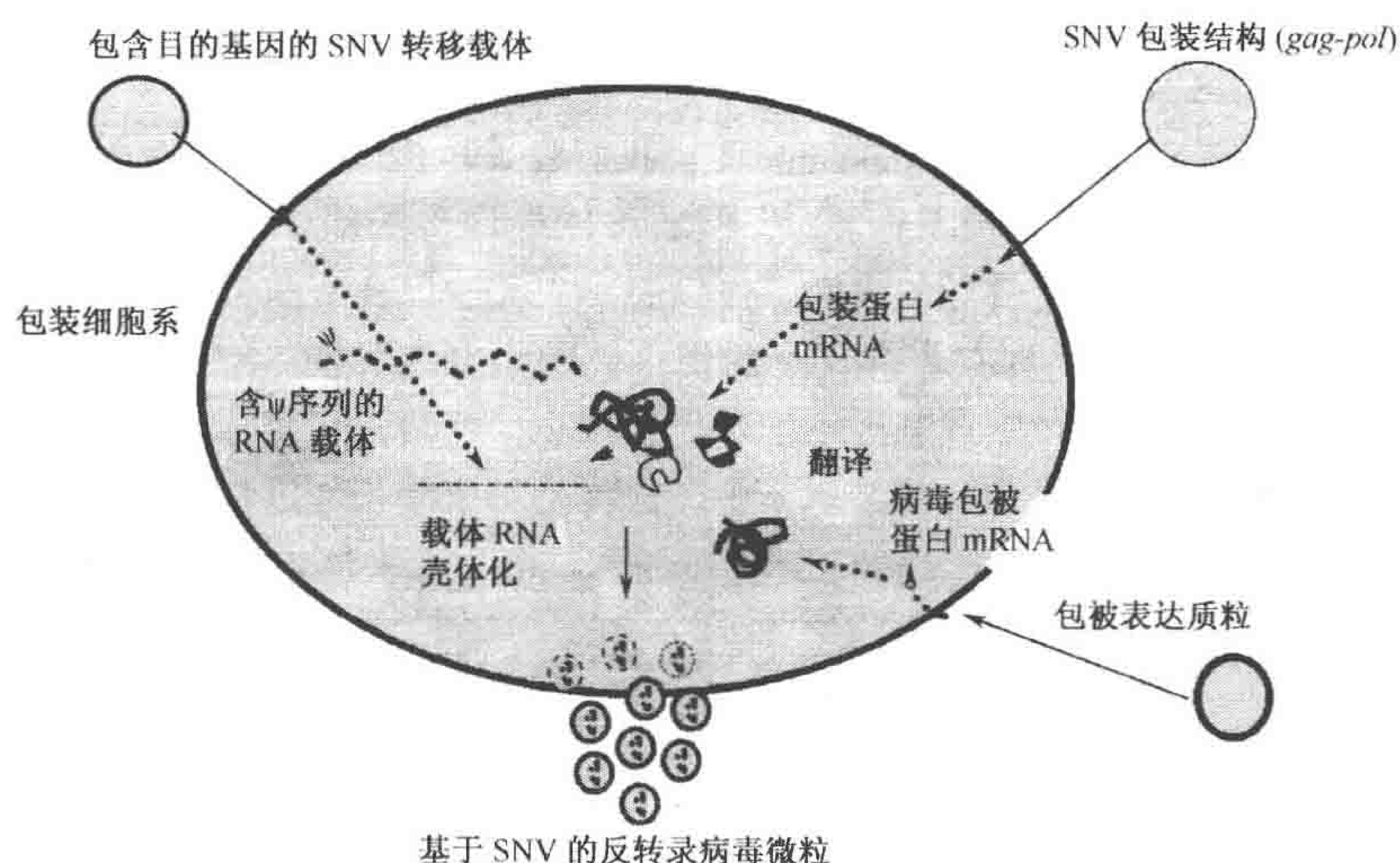



图 1．脾坏死病毒微粒的生成。

大多数实验室采用 293T 和 D17（犬骨肉瘤细胞系）这类对 SNV 复制和感染高度可容的细胞系作为产病毒细胞系（Riggs et al. 1974；Watanabe and Temin 1983)。D17 细胞系偏爱以野生型的包被蛋白包装 SNV 微粒。我们已描述了几种转染方法。磷酸钙($CaPO_4$）转染方法是介导 DNA 进入包裹细胞系，特别是对反转录病毒载体生成的一种非常有效的方法。将 DNA 与磷酸钙混合形成 $CaPO_4$-DNA 复合物，此复合物通过内

吞作用转移 DNA 到包裹细胞中。虽然许多转染方法对加入质粒的量很敏感，但是在 $CaPO_4$ 转染中，对于 100mm 的平板，转染 DNA 的总量可以达到 30μg。这样有助于共转染三种质粒从而产生反转录病毒载体。

**表 1. 常用的 SNV 载体和包裹细胞系**

| 载体 | 描述 | 参考文献 |
|---|---|---|
| (a)基于 SNV 的禽类反转录病毒 | | |
| pJD214 | 包含 1kb 病毒序列的 SNV 剪切载体 | Dougherty and Temin(1987) |
| pMH105 | 包含 v-*rel*-IRES-*neo* 的双顺反子 SNV 反转录病毒载体 | White and Gilmore(1996) |
| pJD220SVHy | 包含一个表达潮霉素磷酸转移酶 B 基因(hygro)的内源 SV40 启动子的 SNV 载体 | Dougherty and Temin(1987) |
| pIM29 | 表达 SNV 野生型包被 SU 区域 | Martinez and Dornburg(1995a,b) |
| pRD134 | 表达野生型蛋白的 SNV 包被质粒 | Martinez and Dornburg(1995a,b) |
| pRD136 | 表达野生型 *gag-pol* 的 SNV 包装结构 | Martinez and Dornburg(1995a,b) |
| pZP32 | 在基质区域突变的 SNV 包装结构 | Parveen et al. (2000,2003) |
| pZP36 | SNV 反转录载体,用于生成表达 LacZ 的病毒微粒 | Parveen et al. (2003) |
| pEM12 和 13 | 表达抗 HIV-1 基因的双顺反子载体 | Marusich et al. (2005) |
| (b)用于 SNV 载体的包装细胞系 | | |
| D17 | 犬骨肉瘤细胞系,可被 SNV、REV-A 和鼠类白血病毒[a]感染 | Riggs et al. (1974) |
| C3A2 | D17 细胞系系列,表达 REV-A *gag-pol* 和 *env* | Watanabe and Temin(1983) |
| DSH134G | SNV 包装细胞系 | Martinez and Dornburg(1995a,b) |
| DSH-cxl | 带有 β-gal 标记的 SNV 包被细胞系 | |

[a]REV-A 和 SNV 90%以上同源。关于 REV-A 蛋白，先前已有其高效包被 SNV 载体的报道（Yin and Hu 1997）。

水泡性口炎病毒 G（VSV-G）蛋白经常被用于替代包括 SNV 的反转录病毒的包被蛋白（Lee et al. 2001）。REV-A 和 SNV 在自然状态下都不会感染人类细胞（Gautier et al. 2000）。但是当它们被表达特异性针对人类细胞表面受体（Parveen et al. 2003）的靶向配体的 VSV-G（Parveen et al. 2003）或包被蛋白假型之后，这些病毒载体就能高效地感染人类细胞。与野生型 SNV 包被相比，VSV-G 蛋白的主要优点之一是它们可以通过超速离心浓缩而达到高滴度。有丝分裂后期的分化细胞用任何病毒载体系统都很难转导。假型 SNV 载体能够在体内外选择性地转导有丝分裂后期细胞，如神经元细胞（Parveen et al. 2003）。这对于各种神经紊乱的基因治疗非常有用。

此章节的方法主要是针对体外研究。在反转录病毒的临床应用方面存在几个载体的产生程序，并且正在越来越多地被标准化。美国国家健康研究所（NIH）的 DNA 重组咨询委员会分别为美国基因转移的临床试验的每个操作流程进行了审查。操作反转录病毒载体的最低安全级别即生物安全级别 2。在美国，国家健康研究所和疾病控制中心需要由各机构的机构审查委员会（IRB）和机构生物安全委员会对反转录病毒载体的操作进行审查。但是，全球的安全标准应该随着反转录病毒载体的应用而制定。采用传统方

法产生的病毒颗粒的滴度是不足以进行临床应用的。今后，发展产生病毒载体的合适策略，以及注重病毒载体在基因治疗应用中稳定性的研究是必需的。

**方案**

## 基于 SNV 载体体系的反转录病毒的生成以及它们在各种细胞类型转导中的应用

此操作流程描述了基于 SNV 载体体系的反转录病毒颗粒的生成。这些微粒被用于各种细胞类型的转导。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

氯化钙（$CaCl_2$）（2mol/L）< !>

溶解 14.7g $CaCl_2$ 于 100ml $H_2O$ 中。过滤除菌或高压灭菌。

转染的细胞系：293T 和 D17（ATCC）

甘油（10%～20%）（合适的）

Hank 平衡盐溶液（HBSS）

2×HEPE 缓冲液（HBS：280mmol/L NaCl、10mmol/L KCl< !>、1.5mmol/L $Na_2HPO_4$< !>、12mmol/L 葡萄糖、50mmol/L HEPES，pH7.5）

LacZ 染色试剂（Chemicon）

培养基

完全培养基：DMEM 培养基含 10%胎牛血清 FCS（293T 细胞）或 FBS（D17 细胞）、1%青 链霉素< !>、1%谷氨酸

无血清培养基，含 1%青链霉素、1%谷氨酸

磷酸盐缓冲液（PBS）（合适的；若操作甘油休克则需要）

无核酸酶水

用于生成反转录病毒的质粒

编码病毒包被蛋白的质粒

含有目的基因的基因转移载体

编码 Env 蛋白的质粒

基于 SNV 和 REV-A 的病毒被表达特异性针对人类细胞表面受体的靶向配体的 VSV-G 或其他 Env 包被蛋白假型。

用作转染的质粒 DNA 的质量对于生成高滴度的反转录病毒载体是至关重要的。它应该是超纯的，应避免任何化学污染物，RNA 或蛋白质。我们建议用于反转录病毒颗粒生成的纯化的 DNA 的 $A_{260}$ ∶ $A_{280}$ 值大于 1.8。

聚凝胺

Transfenctam 试剂（Promega）（合适的）

## 仪器

细胞培养皿［100mm（或采用利于多次转染的 12 孔或 24 孔板）和 6 孔板］
离心管（15ml）
滤器：乙酸或聚磺酸纤维素（结合小分子蛋白质），0.45μm 滤膜
孵箱，预设到 37℃
小离心管（1.5ml，灭菌的）
显微镜
移液管（1.0ml 或巴斯德吸管）
摇床
超速离心机（Beckman），SW41 转头

# 方法

## 细胞的准备

1. 转染前 24h，用完全培养基种植 293T 或 D17 细胞在 100mm 平板中，过夜生长。种植密度决定于细胞的增殖能力。一般来说，100mm 的平板种植 $0.5\times10^6$ ～ $0.8\times10^6$。
2. 观察细胞密度，汇合度应为 75％～80％。用 10ml 新鲜的完全培养基替换原培养基。孵育 4～6h。

细胞汇合度在获得最佳的病毒滴度中起主要作用。

## 转染

此方法适用于 100mm 细胞培养板。DNA 的转染量应随着用于转染的培养板的大小而变化。试剂（$CaCl_2$、2×HEPE 缓冲液、无核酸酶水）可以自制或购买（如 Promega 的 ProFection Mammalian Transfection System- $CaPO_4$）。

3. 对每个 100mm 平板，向已灭菌的 1.5ml 小离心管中加入 0.5ml 2×HEPES 缓冲液，标记为管 1。

对于多个转染，用 12 或 24 孔板来准备转染混合物更简单。

4. 另一管标记为管 2，加入 10μg Gag-Pol 包被质粒，4～5μg Env（VSVG 或 SNV 野生型）包被质粒和 10μg 转染载体。质粒 DNA 的总量不应超过 30μg。加入 62μl 2mol/L $CaCl_2$ 和足量的无核酸酶水，使总体积达到 0.5ml。
5. 用 1.0ml 移液管或巴斯德吸管将管 2 中的混合物逐滴加入管 1 中并用力吸打。

或者在加入管 2 的过程中振荡管 1。最终溶液将生成沉淀，沉淀呈乳白色。

6. 室温下放置混合物 20～30min。
7. 用吸液管上下吹打或振荡使沉淀混合均匀。
8. 加 1ml 悬液和 5ml 无血清培养基到含 293T 或 D17 细胞的平板中。逐滴缓慢地加入混合悬液并轻柔漩涡。

9. 37℃孵育 4～6h。用含 10%FCS 的新鲜培养基替换原培养基。孵育 36～40h 使产生重组病毒。

## 甘油休克（合适的）

一些实验室在这一步进行甘油休克，以增加细胞核对导入 DNA 的吸收。在我们基于 SNV 反转录病毒微粒生成的实验中，用甘油休克处理细胞与否没有很大的区别。

10. 若选择甘油休克，则如下操作：
   a. 吸去培养基，用 5ml PBS 或培养基洗两次。在清洗过程中摇晃平板并在显微镜下观察，以确保大部分沉淀物被移去。若还有很多沉淀则重复清洗。
   b. 加入 2ml 已确定浓度的甘油到细胞中，2～4min。
      甘油的百分比在 10%～20%，应根据经验决定。通常情况下，若对细胞的增殖能力无影响，则使用较高百分比的甘油。
   c. 弃去甘油，PBS 清洗，加 10ml 新鲜培养基。

## 反转录病毒载体上清的收集

11. 对于基于 SNV 载体生成的病毒，在更换培养基 36～40h 后，收集转染的 293T 或 D17 细胞的上清液。将其至于 15ml 离心管中，1500r/min 离心 5min，弃去细胞碎片。
12. 转移上清。立即用于滴度测定或－80℃冷冻直至需要用于转染。对于基于 SNV 和 REV-A 的载体系统而言，用生物学滴度来衡量病毒的产量。上清要注意避免多次冻融，因为这样会导致反转录病毒滴度的严重减少。

## 反转录病毒微粒的浓缩

13. 通过 0.45μm 的滤膜过滤反转录病毒载体上清液。
    不要用消化纤维滤膜，因为蛋白质会与滤膜结合，从而毁坏病毒膜表面。
14. Bekman 超速离心机 SW4 转头，4℃，25 000r/min 离心 2h 上清液。
15. 缓慢地弃去上清，不搅动沉淀。用 50μl HBSS 重悬含反转录病毒微粒的沉淀。
16. 确定浓缩的反转录病毒的滴度，详见下部分所描述，或－80℃冻存至下次应用。
    由于冻融明显的减少滴度，特别是对 SNV，所以最好现用现制。

## 确定反转录病毒的转导效率

此流程需要 *lacZ* 或其他报道基因整合到转移载体中。

17. 确定反转录病毒滴度方法如下：
   对于贴壁细胞
   a. 种植靶细胞 D17（用于确定 SNV 野生型包被假型的滴度）或 293T，完全培养基，密度小于 $1\times10^6$ 个/100mm 平皿。生长 24h。
   b. 弃去培养基，加 1ml 病毒载体上清液，其中包含反转录病毒微粒和浓度为 10μg/ml 的聚凝胺。
      或者，使用 Transfectam 试剂，浓度为 2μg/ml。据观察，Transfectam 试剂比聚凝胺毒

性小。

c. 3～5h 后（根据细胞类型），用 10ml 新鲜培养基替换含有病毒的培养基。继续培养细胞 48h。

病毒感染细胞 5～6h 后为半剂量转染。过夜则为最大剂量转染。

d. 若有诸如 *lacZ* 报道基因的存在，则由 lacZ 试剂染色并计数蓝色细胞，从而以克隆形成单位（cfu）/ml 表示滴度。

若采用的是其他报道基因，则可采取免疫细胞化学或实时聚合酶链反应（PCR）的方法，来精确检测基因表达和病毒滴度。

**对于非贴壁细胞的转导（悬浮细胞）**

a. 转染前于 6 孔板中种植靶细胞 12～18h，密度为 $1.5\times10^6$ 个/ml 培养基。

b. 离心悬液中的细胞。在聚凝胺（8μg/ml）或 Transfectam（2μg/ml）存在的情况下，在病毒载体悬液中以 $1.5\times10^6$ 个/ml 的密度重悬细胞。如前所述，Transfectam 由于毒性较小，是较好的选择。

c. 若采用聚凝胺作为转染试剂，则观察它对于细胞增殖和生长的作用是必需的，因为悬浮细胞相对于贴壁细胞而言，其毒性效应更敏感一些。在振荡器上摇晃平板。

对 SNV，要产生最佳的转染效率，则聚凝胺的浓度在 8～30μg/ml。

d. 4～5h 后离心弃去病毒微粒，完全培养基孵育 48h，如贴壁细胞所述。

e. 为了进一步增加效率，起始转染 12～24h 后可进行多次转染。

f. 固定并计数转染的细胞，确定 cfu/ml。

**采用基于 SNV 的反转录病毒微粒转导有丝分裂后的神经元细胞**

此方法用于转移 *lacZ* 报道基因到有丝分裂后的分化的神经元细胞。

a. 根据先前由 Mukhtar 等所描述的程序准备有丝分裂后的分化的神经元细胞。

b. 用反转录病毒微粒悬液和 Transfectam 试剂（2μg/ml）混合覆盖细胞。放置 2h。

c. 重复反转录病毒微粒覆盖程序 3 次，间隔 24h，

d. 通过互补技术，确定这些有丝分裂后细胞中报道基因或治疗基因的表达。

## 致谢

本工作得到了 NIH：MH074359（Z. P.）和 MH074375（M. H.）基金的资助。作者感谢 Edword Acheampong 博士、Rita M. Victor 和 Brenda O. Gordon 参与本书的编写工作。

## 参考文献

Acheampong E.A., Parveen Z., Muthoga L.W., Kalayeh M., Mukhtar M., and Pomerantz R.J. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Nef potently induces apoptosis in primary human brain microvascular endothelial cells via the activation of caspases. *J. Virol.* **79:** 4257–4269.

Ailles L.E. and Naldini L. 2002. HIV-1-derived lentiviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261:** 31–52.

Dornburg R. 1995. Reticuloendotheliosis viruses and derived vectors. *Gene Ther.* **2:** 301–310.

——. 2003. The history and principles of retroviral vectors. *Front. Biosci.* **8:** d818–835.

Dornburg R. and Pomerantz R.J. 2000. HIV-1 gene therapy: Promise for the future. *Adv. Pharmacol.* **49:** 229–261.

Dougherty J.P. and Temin H.M. 1987. A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3′ RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84:** 1197–1201.

Gautier R., Jiang A., Rousseau V., Dornburg R., and Jaffredo T. 2000. Avian reticuloendotheliosis virus strain A and spleen

necrosis virus do not infect human cells. *J. Virol.* **74:** 518–522.

Kim S.H., Kim S., and Robbins P.D. 2000. Retroviral vectors. *Adv. Virus Res.* **55:** 545–563.

Kurian K.M., Watson C.J., and Wyllie A.H. 2000. Retroviral vectors. *Mol. Pathol.* **53:** 173–176.

Lee H., Song J.J., Kim E., Yun C.O., Choi J., Lee B., Kim J., Chang J.W., and Kim J.H. 2001. Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor. *Gene Ther.* **8:** 268–273.

Martinez I. and Dornburg R. 1995a. Improved retroviral packaging lines derived from spleen necrosis virus. *Virology* **208:** 234–241.

———. 1995b. Mapping of receptor binding domains in the envelope protein of spleen necrosis virus. *J. Virol.* **69:** 4339–4346.

Marusich E.I., Parveen Z., Strayer D., Mukhtar M., Dornburg R.C., and Pomerantz R.J. 2005. Spleen necrosis virus-based vector delivery of anti-HIV-1 genes potently protects human hematopoietic cells from HIV-1 infection. *Virology* **332:** 258–271.

Mitchell R.S., Beitzel B.F., Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C.C., Ecker J.R., and Bushman F.D. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* **2:** E234.

Mukhtar M., Duke H., BouHamdan M., and Pomerantz R.J. 2000. Anti-human immunodeficiency virus type 1 gene therapy in human central nervous system-based cells: An initial approach against a potential viral reservoir. *Hum. Gene Ther.* **11:** 347–359.

Naldini L. 1999. In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thromb. Haemostasis* **82:** 552–554.

Naldini L. and Verma I.M. 2000. Lentiviral vectors. *Adv. Virus Res.* **55:** 599–609.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Palu G., Parolin C., Takeuchi Y., and Pizzato M. 2000. Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol.* **10:** 185–202.

Parveen Z., Krupetsky A., Engelstadter M., Cichutek K., Pomerantz R.J., and Dornburg R. 2000. Spleen necrosis virus-derived C-type retroviral vectors for gene transfer to quiescent cells. *Nat. Biotechnol.* **18:** 623–629.

Parveen Z., Mukhtar M., Rafi M., Wenger D.A., Siddiqui K.M., Siler C.A., Dietzschold B., Pomerantz R.J., Schnell M.J., and Dornburg R. 2003. Cell-type-specific gene delivery into neuronal cells in vitro and in vivo. *Virology* **314:** 74–83.

Riggs J.L., McAllister R.M., and Lennette E.H. 1974. Immunofluorescent studies of RD-114 virus replication in cell culture. *J. Gen. Virol.* **25:** 21–29.

Watanabe S. and Temin H.M. 1983. Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Mol. Cell. Biol.* **3:** 2241–2249.

White D.W. and Gilmore T.D. 1996. Bcl-2 and CrmA have different effects on transformation, apoptosis and the stability of I kappa B-alpha in chicken spleen cells transformed by temperature-sensitive v-Rel oncoproteins. *Oncogene* **13:** 891–899.

Yin P.D. and Hu W.S. 1997. RNAs from genetically distinct retroviruses can copackage and exchange genetic information in vivo. *J. Virol.* 6237–6242.

# 第九章 泡沫病毒载体的生成和对造血干细胞的转导

Neil C. Josephson[*,†]和 David W. Russell[†]

[*] Puget Sound Blood Center, Seattle, Washington 98104; [†] Division of Hematology, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98112

姜 琳 译



## 摘要

泡沫病毒（FV）或 spumavirus，是作为整合型病毒载体发展的非病原的反转录病毒。FV 载体几个潜在的优势包括广宿主范围、强大的包装能力，以及稳定的包含双链 DNA 的整合前复合物。FV 对于干细胞，包括各种造血干细胞的转导尤其高效。

## 引言

FV 是泡沫病毒家族中的整合型病毒，是区别于肿瘤病毒如鼠白血病病毒和慢病毒如人类免疫缺陷病毒的一类反转录病毒。野生型 FV 基因组像其他反转录病毒一样（图 1），包括 *gag*、*pol*、*env* 基因和位于 *env* 与病毒长末端重复序列（LTR）之间的 *bel* 基因。由 *env* 上一个内部启动子转录的 *bel*1 或 *tas* 基因（Lochelt et al. 1993），编码 LTR 启动子表达所需的转录激活子（Keller et al. 1991; Rethwilm et al. 1991; Venkatesh et al. 1991）。我们实验室（Hirata et al. 1996; Russell and Miller 1996; Trobridge and Russell 1998; Trobridge et al. 2002b）及其他实验室（Erlwein et al. 1998; Heinkelein et al. 1998; Wu et al. 1998; Schwantes et al. 2002）发展了基于 FV 的反转录病毒载体，已经稳定表达很多年。早期的载体是可复制型（Schmidt and Rethwilm 1995）或被可复制的 FV 频繁感染的（Russell and Miller 1996）。然后通过移动必要的 *bel*1（*tas*）基因（Trobridge and Russell 1998）和去除载体中的非必需序列（Wu et al. 1998; Heinkelein et al. 2002; Trobridge et al. 2002b）来消除可复制型 FV。FV 载体潜在的优势包括野生型病毒无病原性、宿主面广、稳定的病毒颗粒可以超速离心浓缩、双链 DNA 基因组可

在载体生成细胞中反转录，以及所有反转录病毒最大的包装能力。

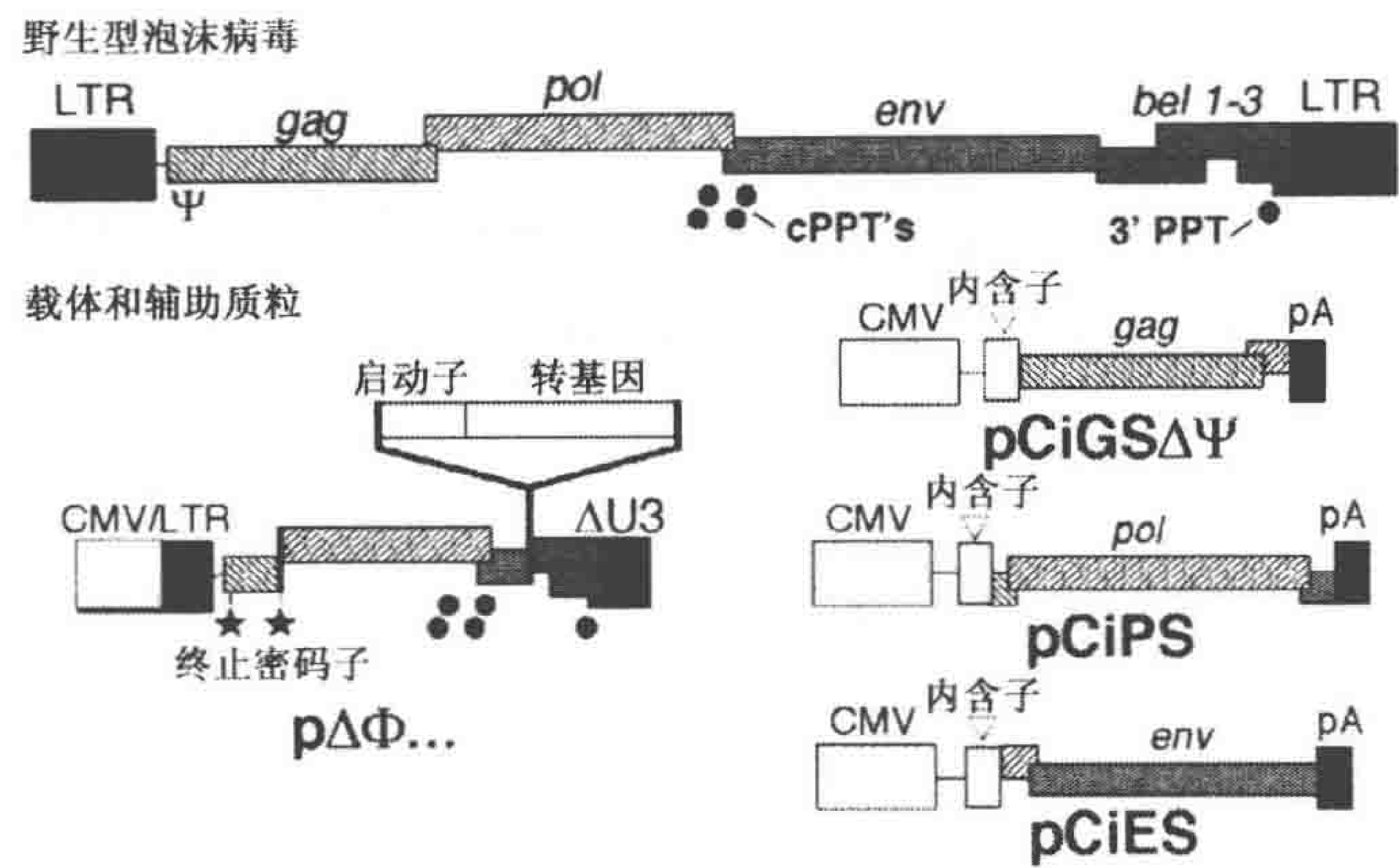



图 1. 4 个质粒 FV 载体生成体系。

我们当前的 FV 载体生成流程是四个质粒的瞬时转染体系（图 1）（Trobridge et al. 2002b）。pΔΦ（泡沫缺失）载体质粒只保有基本的顺式作用序列，包括包装信号 ψ，pol 3′端的顺式作用区域包括中央多聚嘌呤序列（cPPT）和 3′PPT 序列。一个杂合的巨细胞病毒（CMV）-LTR 融合启动子起始载体基因组的转录。终止密码子被引入到 *gag* 的 5′区，所以此载体不会编码任何病毒基因产物。对于 *gag*、*pol* 和 *env* 有独立的辅助质粒。载体转基因由一个内部的启动子启动。FV 载体由转染的 293 细胞生成，收集并过滤培养基，超速离心以浓缩载体病毒颗粒（Trobridge et al. 2002a）。最后用敏感标志辅助分析去除可复制的辅助病毒（Trobridge and Russell 1998）。一般 23 个 10cm 平板可以得到终体积 2ml，滴度为 $10^7$～$10^8$ 转染单位/ml 的病毒颗粒。

FV 载体对于转染造血干细胞尤其有利（表 1）。因为造血干细胞在移植后具有自我更新、增殖并在骨髓移植后重新产生不同血细胞的能力，高效的转染可以为许多遗传和后天疾病的治愈提供条件。造血干细胞可以从脊髓、外周血和脐带血中获得。但是，若培养 24h 以上，则会很快地丧失再生能力（Peters et al. 1996；Gothot et al. 1998）。重要的是，人类干细胞的研究（Josephson et al. 2002）证明高效的 FV 载体基因转导体外培养时间只需 10h。

**表 1. 利用 FV 载体转导造血细胞已发表的报告**

| FV 载体系列 | 造血细胞 | 报道基因 | 转导率/% | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| PFV | 小鼠，骨髓 | AP | 43 | |
| | 狒狒，CD34+骨髓 | AP | 11 | Hirata et al. 1996 |
| | 人类，CD34+骨髓 | AP | 27～40 | |
| PFV | 小鼠，经 5FU 处理的骨髓 | AP，GFP | 5～55 | Vassilopoulos et al. 2001 |
| PFV | 人类，CD34+脐带血 | GFP | 12～80 | Josephson et al. 2002 |
| SFV-1 | 人类，CD34+脐带血 | LacZ | 4～27 | Zucali et al. 2002 |
| PFV | 小鼠，lin-骨髓 | GFP | 44 | Vassilopoulos et al. 2003 |
| PFV | 人类，CD34+脐带血 | GFP | 62～84 | Leurs et al. 2003 |
| PFV | 人类，CD34+脐带血 | GFP | 65～75 | Josephson et al. 2004 |
| | 人类，CD34+外周血 | | 35～42 | |

PFV：原型泡沫病毒（Achong et al. 1971）；SFV-1：1 型猴泡沫病毒；AP：碱性磷酸酶；GFP：绿色荧光蛋白；LacZ：β-半乳糖苷酶。

## 方案

# FV 载体的生成和造血干细胞的转导

此方法生成无复制型反转录病毒污染的高滴度 FV 载体，适用于转导造血干细胞。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

使用双蒸水和灭菌技术。

牛血清白蛋白（BSA）片段 V

$CaCl_2$（2.0mol/L）< !>

溶解 29.4g $CaCl_2$ 于 100ml $H_2O$ 中。过滤除菌。4℃储存。

细胞

293 细胞许多不同的亚克隆（Graham et al. 1977）都适用。选择一个已知的具有高转染效率的亚克隆。冻存多管以确保可重复性。转染前不要让细胞长过。一个冻存管可以复苏并在生长培养基中维持生长 4～6 周用于转染。这之后，再复苏一个新管。

氯喹（100mmol/L）< !>

于 10ml 水中溶解 0.52g 磷酸氯喹。过滤，4℃储存。

细胞因子（对靶细胞有特异性）

干细胞因子（SCF）

Flt3-配体（FL）

血小板生成素（TPO）

D10

D10 即 DMEM 加 10%热灭活的 FBS，100 单位/ml 青霉素 G 和 100μg/ml 链霉素< !>。

二甲基亚砜（DMSO，5%）< !>

DMEM 培养基

胎牛血清（FBS），热灭活（56℃，30min）

造血细胞

可以用已商业化的试剂和方法（Miltenyi Biotec，Auburn，California），采用磁珠将来自脊髓、外周血或脐带血的人类 $CD34^+$ 细胞分离出来。鼠的造血细胞可以从骨髓和 Miltenyi 体系缺陷系中获得。用 5-氟尿嘧啶（5FU）对鼠进行预处理有利于干细胞的富集（Vassilopoulos et al. 2001）。此优化程序适用于非组织培养 6 孔板的造血再生细胞的转导。若用不同面积的平板或培养皿，则应相应的调整细胞密度和试剂体积。

2×HEPES 盐

于 400ml 水中溶解 8.18g NaCl 和 5.96g HEPES。用 0.5mol/L NaOH 调整 pH 为 7.10，用水调整终体积为 500ml，过滤。最终溶液为 280mmol/L NaCl 和 50mmol/L HEPES。4℃储存。

人类纤连蛋白片段 CH-296（RetroNectin，Takara Shuzo，Otsu，Japan）

用无菌水溶解冻干的 RetroNectin 至 1mg/ml 浓度。0.22μm 滤膜过滤。−20℃保存。

磷酸缓冲液（PBS），无钙镁离子

磷酸混合液

将 4.95ml 1.0mol/L $NaH_2PO_4$ <!>（于 100ml 水溶解 12g 单价盐），10.05ml 1.0mol/L $Na_2HPO_4$ <!>（100ml 水中溶解 26.8g 二代磷酸盐）和 85ml 水混合。过滤，4℃储存。

质粒 DNA

ΔΦ 质粒载体（含有目的基因）

辅助质粒：PCiGSΔψ、pCiPS、pCiES

质粒 DNA 可以用 QIAGEN 试剂盒或 CsCl 梯度离心纯化，用苯酚和氯仿萃取，乙醇沉淀后 TE 中重悬（pH 8.0）。质粒可以在 68℃下热处理 30min 以消灭细菌防止污染。四个质粒 FV 载体生成体系的细节详见图 1。

丁酸钠（500mmol/L）

溶解 5.5g 丁酸钠于 100ml DMEM 中。过滤，−20℃储存。

转导培养基

浓缩的载体在含 20%FBS 的 DMEM 中，并且此 DMEM 含下列细胞因子（对靶细胞有特异性）：干细胞因子（SCF）、Flt3-配体（FL）、血小板生成素（TPO），浓度各为 100ng/ml。

TE：1×(配方如下）和 0.1×溶液

10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）

1mmol/L EDTA

## 仪器

离心管（2 个 250ml 或几个 50ml 管）

离心机（Beckman SW 28 转头和管）

Millipore 滤器（0.45μm 和 0.22μm；0.45μm Stericup/Steritop 滤器，Durapore PVDF，SCHVU02RE）

平板（6 孔板）

Slide-A-Lyzer 试剂盒（10K m.w. cutoff；Pierce Biotechnology，66450）

组织培养皿（10cm）

37℃水浴

## 方法

### FV 载体的生成

1. 转染前 24h，用 10ml D10 于组织培养皿（10cm）接种 $3.25\times10^6$ 个 293 细胞，共 23 盘，过夜培养。
2. 用磷酸钙-DNA 沉淀转染细胞。
   a. 将下列组合准备 9.2ml DNA 溶液：
      1.15ml 2.0mol/L $CaCl_2$

272μg ΔΦ 质粒载体（含目的基因）

272μg PCiGSΔψ

34.5μg pCiPS

16.9μg pCiES

8.05ml 无菌水

b. 将下述混合准备 9.2ml HEPES：

9.1ml 2×HEPES 盐

92μl 磷酸混合液

c. 向 HEPES 中逐滴加入 DNA 溶液并轻微混匀。一旦混合后，立即加入 64μl 100mmol/L 氯喹（终浓度为 25μmol/L）。

d. 孵育沉淀 10min，向每 10cm 平皿中直接加入 800μl。避免吹起细胞。慢慢晃动平板使沉淀分散均匀。

e. 细胞孵育 4～6h 使它们整合进 DNA，然后向每盘加入 200μl 500mmol/L 丁酸钠。孵育过夜。(见疑难解答)

3. 早上，以新鲜的温的 D10 更换培养基（避免吹起细胞），继续孵育 48h。
4. 收集培养基于 250ml 离心管中（或几个 50ml 管），300 *g* 离心 5min。弃去上清，通过一个 250ml，0.45μm Millipore Stericup/Steritop 滤器过滤。转移上清到 Beckman SW 28 转管（36ml/管），约 50 000 *g*，20℃离心 2min。
5. 小心吸取上清（避免接触管底）。向每个 SW28 管中加入 250μl 培养基用于后续转导(含血清更佳)。反复吹打使载体颗粒溶解，同时尽量避免泡沫的生成。将溶解的微粒从一管转移至另一管中，并追加 500μl 培养基。微粒的终体积应为 2.0ml。

   可以用新鲜或－80℃冷冻的液体，在含 5%DMSO 的情况下储存。用含 5%DMSO 的培养基重悬微粒或在摇晃过程中逐滴加入纯的 DMSO，可以使 DMSO 与微粒的直接接触最小化。

## 转导造血细胞

6. 用 CH-296（RetroNectin）加入 1ml 用 PBS 稀释为终浓度 50μg/ml 的储备液，封闭 6 孔板。室温下孵育 2h，弃去 RetroNectin 溶液，加 2ml 含 2%BSA 的 PBS。继续孵育 30min，然后用 2ml PBS 清洗平板。这时封闭的平板已可使用。
7. 若使用冷冻的存储 FV 载体，将其于 37℃水浴中迅速解冻，或稀释或用 Slide-A-Lyzer 试剂盒于室温下用 500ml DMEM 无菌透析 2h，使 DMSO 终浓度减少至≤1%。
8. 用一个已透析的、稀释的或新鲜浓缩的载体准备转导培养基。调整载体体积和细胞数（见步骤 9～10）以达到多重性转染，1～20 转导微粒/细胞。
9. 用转导培养基重悬造血细胞，浓度为 $0.5\times10^6$～$1.0\times10^6$ 个/ml。若使用冷藏的细胞，转导前将其在 37℃水浴中解冻。用含 20%热灭活 FBS 的 DMEM 10ml 清洗细胞，220 *g* 离心 5min，然后用含载体的转导培养基重悬细胞。
10. 向步骤 6 中准备的 CH-296（RetroNectin）封闭的 6 孔板中加入 1.5ml 转导培养基($0.75\times10^6$～$1.5\times10^6$ 个/孔)，孵育 10～24h。
11. 转导后，摇晃培养基，移走贴壁不牢的细胞，每孔用 2.0ml PBS 重复收集，并与最

初的收集结合。显微镜下观察确保所有的细胞都被收集。

被转导的细胞可在液体培养基中生长，用于干细胞克隆反应或动物移植实验。

## 疑难解答

问题（步骤 2）：低转染效率。

解决方法：HEPES 盐溶液的 pH 对转染效率有至关重要的影响。如果滴度很低，准备一系列溶液 pH 范围为 7.0～7.2，转染某一报道基因质粒并检测，从而确定溶液的最佳 pH。

## 参考文献


Achong B.G., Mansell P.W., Epstein M.A., and Clifford P. 1971. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **46:** 299–307.

Erlwein O., Bieniasz P.D., and McClure M.O. 1998. Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J. Virol.* **72:** 5510–5516.

Gothot A., van der Loo J.C., Clapp D.W., and Srour E.F. 1998. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34+ cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* **92:** 2641–2649.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., and Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36:** 59–74.

Heinkelein M., Schmidt M., Fischer N., Moebes A., Lindemann D., Enssle J., and Rethwilm A. 1998. Characterization of a *cis*-acting sequence in the pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J. Virol.* **72:** 6307–6314.

Heinkelein M., Dressler M., Jarmy G., Rammling M., Imrich H., Thurow J., Lindemann D., and Rethwilm A. 2002. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* **76:** 3774–3783.

Hirata R.K., Miller A.D., Andrews R.G., and Russell D.W. 1996. Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood* **88:** 3654–3661.

Josephson N.C., Trobridge G., and Russell D.W. 2004. Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **15:** 87–92.

Josephson N.C., Vassilopoulos G., Trobridge G.D., Priestley G.V., Wood B.L., Papayannopoulou T., and Russell D.W. 2002. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 8295–8300.

Keller A., Partin K.M., Lochelt M., Bannert H., Flugel R.M., and Cullen B.R. 1991. Characterization of the transcriptional *trans*-activator of human foamy retrovirus. *J. Virol.* **65:** 2589–2594.

Leurs C., Jansen M., Pollok K.E., Heinkelein M., Schmidt M., Wissler M., Lindemann D., von Kalle C., Rethwilm A., Williams D.A., and Hanenberg H. 2003. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum. Gene Ther.* **14:** 509–519.

Lochelt M., Muranyi W., and Flugel R.M. 1993. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 7317–7321.

Peters S.O., Kittler E.L., Ramshaw H.S., and Quesenberry P.J. 1996. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* **87:** 30–37.

Rethwilm A., Erlwein O., Baunach G., Maurer B., and ter Meulen V. 1991. The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 941–945.

Russell D.W. and Miller A.D. 1996. Foamy virus vectors. *J. Virol.* **70:** 217–222.

Schmidt M. and Rethwilm A. 1995. Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210:** 167–178.

Schwantes A., Ortlepp I., and Lochelt M. 2002. Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors. *Virology* **301:** 53–63.

Trobridge G.D. and Russell D.W. 1998. Helper-free foamy virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2517–2525.

Trobridge G., Vassilopoulos G., Josephson N., and Russell D.W. 2002a. Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol.* **346:** 628–648.

Trobridge G., Josephson N., Vassilopoulos G., Mac J., and Russell D.W. 2002b. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther.* **6:** 321–328.

Vassilopoulos G., Wang P.R., and Russell D.W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422:** 901–904.

Vassilopoulos G., Trobridge G., Josephson N.C., and Russell D.W. 2001. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* **98:** 604–609.

Venkatesh L.K., Theodorakis P.A., and Chinnadurai G. 1991. Distinct *cis*-acting regions in U3 regulate trans-activation of the human spumaretrovirus long terminal repeat by the viral bel1 gene product. *Nucleic Acids Res.* **19:** 3661–3666.

Wu M., Chari S., Yanchis T., and Mergia A. 1998. *cis*-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J. Virol.* **72:** 3451–3454.

Zucali J.R., Ciccarone T., Kelley V., Park J., Johnson C.M., and Mergia A. 2002. Transduction of umbilical cord blood CD34+ NOD/SCID-repopulating cells by simian foamy virus type 1 (SFV-1) vector. *Virology* **302:** 229–235.

# 第十章 猿空泡病毒1型载体

Jeonghae Park 和 Ayalew Mergia
Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida 32610
易 翔 译



## 摘要

空泡病毒（FV）是非致病性的反转录病毒，它能将基因有效并安全地转移到不同物种的不同类型的细胞中。这些病毒有着与其他反转录病毒不同的独一无二的复制机制，这是空泡病毒介导基因转移的一个优势。其反转录发生在病毒生命周期的晚期。此时，至少 20% 的病毒粒子包含具有感染能力的双链 DNA 基因组（Yu et al. 1996, 1999; Enssle et al. 1997）。这可能是空泡病毒载体优于其他反转录病毒载体的地方，因为在感染靶细胞之前，反转录已经完成了。空泡病毒载体能有效地运送基因进入人类 $CD34^+$ 造血干细胞（Josephson et al. 2002; Zucali et al. 2002）。通过比较 $CD34^+$ 细胞的转导效率发现空泡病毒载体要优于人类免疫缺陷病毒（HIV）载体（Leurs et al. 2003）。并且有人报道空泡病毒载体能有效地转导静息期细胞（Patton et al. 2004; Trobridge 和 Russell 2004）。然而，转基因的表达需要细胞进行分裂，所以有丝分裂是前病毒基因组运输到核并进行整合所必需的（Patton et al. 2004; Trobridge and Russell 2004）。到目前为止，还未成功地建立起有效的包装细胞系（Wu 和 Mergia 1999）。因此，载体的产生主要依赖于瞬时转染细胞的载体和包装质粒。

## 引言

空泡病毒载体是属于泡沫反转录病毒亚家族的一组反转录病毒。这些病毒能在许多哺乳动物种类中找到，在自然感染和实验感染的动物体内都是非致病性的。空泡病毒能在几个种族的不同细胞类型中有效繁殖（Mergia et al. 1996; Hill et al. 1999）。人类不会携带空泡病毒除非因为职业需要操作动物而感染（Schweizer et al. 1995, 1997; Heneine et al. 1998; Callahan et al. 1999; Wolfe et al. 2004）。我们在分子水平上鉴定了来

自短尾猿的猿猴空泡1型病毒（SFV-1）（图1）。SFV-1的基因组很复杂，它编码病毒的结构基因，*gag*、*pol*、*env*和在*env* 3′端的两个大的可读框（ORF）（Mergia et al. 1991；Mergia and Wu 1998）。空泡病毒在同样的区域的另一条链上也有两个ORF（Flugel et al. 1987；Maurer and Flugel 1988；Renne et al. 1993；Herchenroder et al. 1994；Renshaw and Casey 1994；Winkler et al. 1997；Tobaly-Tapiero et al. 2000）。空泡病毒中的基因表达是瞬时调节的，并在两个启动子的控制下进行差异表达。在*env* 3′端的内在启动子调控早期基因产物Tas和Bet的表达（Lochelt et al. 1993，1994；Campbell et al. 1994；Mergia 1994）。Tas由位于*env*和长的末端重复序列（LTR）之间的第一个可读框编码，与*env*的3′端重叠。它是一个转录的反式激活子，能够极大地增强病毒启动子指导的基因表达（Keller et al. 1991；Mergia et al. 1991；Rethwilm et al. 1991；Venkatesh et al. 1991；Renne et al. 1993；Renshaw and Casey，1994；Herchenroder et al. 1995）。Bet是一个拼接基因的产物包含Tas的头88个氨基酸和Orf-2的最后390个氨基酸（Muranyi and Flugel，1991；Hahn et al. 1994；Mergia et al. 1994）。空泡病毒的突变分析显示*tas*基因是病毒复制所必需的（Lochelt et al. 1991，Baunach et al. 1993，Mergia and Wu 1998），而*orf*-2区域则是可有可无的（Lochelt et al. 1991，Baunach et al. 1993，Mergia and Wu 1998）。有人报道Bet有很多不同的功能（Meiering and Linial 2002；Lochelt 2003），说明这个蛋白质在空泡载体复制中具有多重作用。然而，因为*orf*-2区域不是关键的，因此在细胞培养系统中，Bet对病毒复制也是可有可无的。

通过删除*tas*基因，并将载体的基因组置于异源启动子的控制下，我们很容易构建复制缺陷的空泡病毒载体（Trobridge and Russel 1998；Park and Mergia 2002）。在缺少*tas*的情况下，病毒不能复制，尽管重组有可能产生能够复制的完整的空泡病毒载体。我们已经构建了几个SFV-1载体（Mergia and Wu 1998，Wu et al. 1998；Wu and Mergia 1999；Park et al. 2002）。空泡病毒载体能容纳9kb大小的异源DNA，这比大多数其他的反转录病毒的容量要大（Park et al. 2002；Trobridge et al. 2002）。通过去掉*env-tas*和*gag*、*pol*区域，去掉聚嘌呤上游的*orf*-2序列，并在LTR的3′U3区域删除1000个核苷酸，就可以构建一个有9kb异源DNA插入的SFV-1载体（Park et al. 2002）。5′非翻译区、5′-*gag*、3′-*pol*编码序列是空泡病毒载体介导的基因转移所必需的重要的顺式序列。因为*pro-pol*基因产物是从一个亚基因组信息中翻译的，缺乏*gag*序列（Bodem et al. 1996；Yu et al. 1996），所以3′-*pol*区域可能在Pol与病毒颗粒结合的过程中发挥作用（Heinkelein et al. 2002）。尽管SFV-1载体能容纳9kb的插入，但是当*gag-pol*区域被完整地保留在载体（pCCGL，图1B）中时，能获得更高的载体产量滴度（10～100倍）。6.5kb的片段都能被放进这样一个载体。在pCCGL中，载体基因组在细胞巨化病毒（CMV）启动子的调控下表达。含有结构性基因的辅助质粒能够以一个转录单元（*gag-pol-env*）、两个转录单元（*gag-pol*和*env*）、三个转录单元（*gag*、*pol*和*env*）的方式提供（图1C）。这些辅助质粒也能在CMV启动子控制下表达。这些包装载体的产量是相似的。因为*tas*基因缺失，这些方法都不会产生野生型的病毒。正如上面提到的，我们通常将*gag*、*pol*、*env*构建进不同的包装质粒，以避免重组事件的发生（Trobridge et al. 2002）。

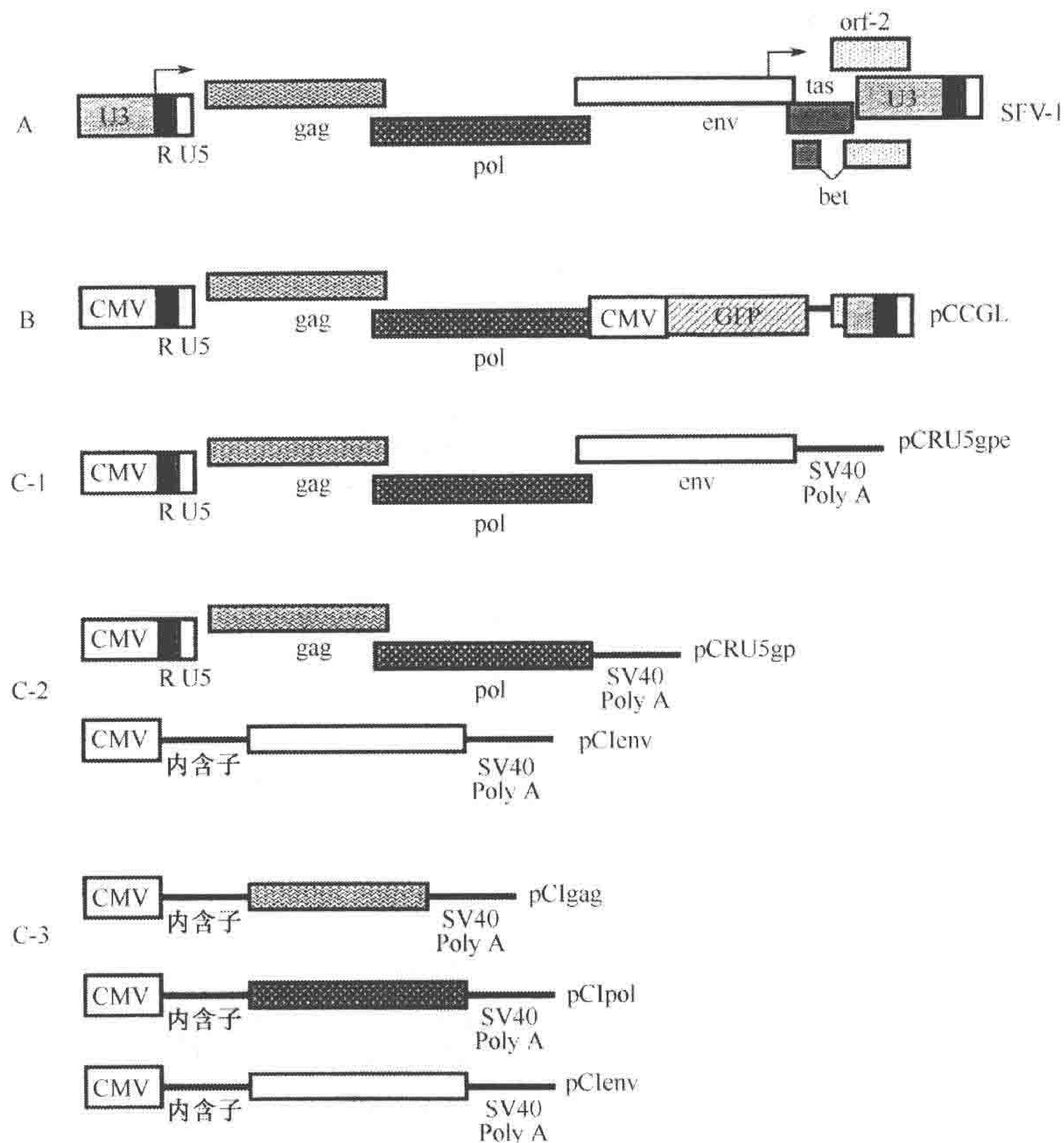



图 1. SFV-1 载体系统。A. SFV-1 前病毒基因组。箭头显示 SFV-1 RNA 基因组的转录起始位点和在 *env* 末端的内部启动子控制下的早期基因产物。B. 含 GFP 报道基因的 SFV-1 载体。C. *gag-pol-env* 作为一个转录单位的包装质粒（C-1）；*gag-pol* 和 *env* 作为两个独立转录单位的包装质粒（C-2）；*gag*、*pol*、*env* 作为三个转录单位的包装质粒（C-3）。CMV 是人类巨细胞病毒瞬时早期基因启动子。

通过共转染载体和包装质粒，可以产生 SFV-1 载体颗粒。这里提供的转染步骤对以前描述的磷酸钙沉淀法进行了一些修改（Jordan et al. 1996）。病毒核心颗粒不会在缺少外壳蛋白的细胞中释放，说明空泡病毒的组装在反转录病毒中是独一无二的（Baldwin and Linial 1998；Fischer et al. 1998）。事实上，与其他反转录病毒不同，空泡病毒载体不能与其他外壳蛋白［如水泡性口炎病毒 G 蛋白（VSV-G）］进行假型化，这也再次证明空泡病毒的成熟过程是独一无二的（Wu and Mergia 1999）。幸运的是，空泡病毒能被浓缩而不会显著地丢失感染性，说明空泡病毒的外壳不像其他反转录病毒那样脆弱（Hill et al. 1999）。

## 方案

### SFV-1 载体的制备

该方案描述了 SFV-1 载体制备和浓缩的方法（图 2）。瞬时转染病毒载体和包装质

粒能产生 $10^7$ 个/ml 滴度的 SFV-1 载体。该载体能进一步浓缩 100～200 倍而滴度没有明显变化。

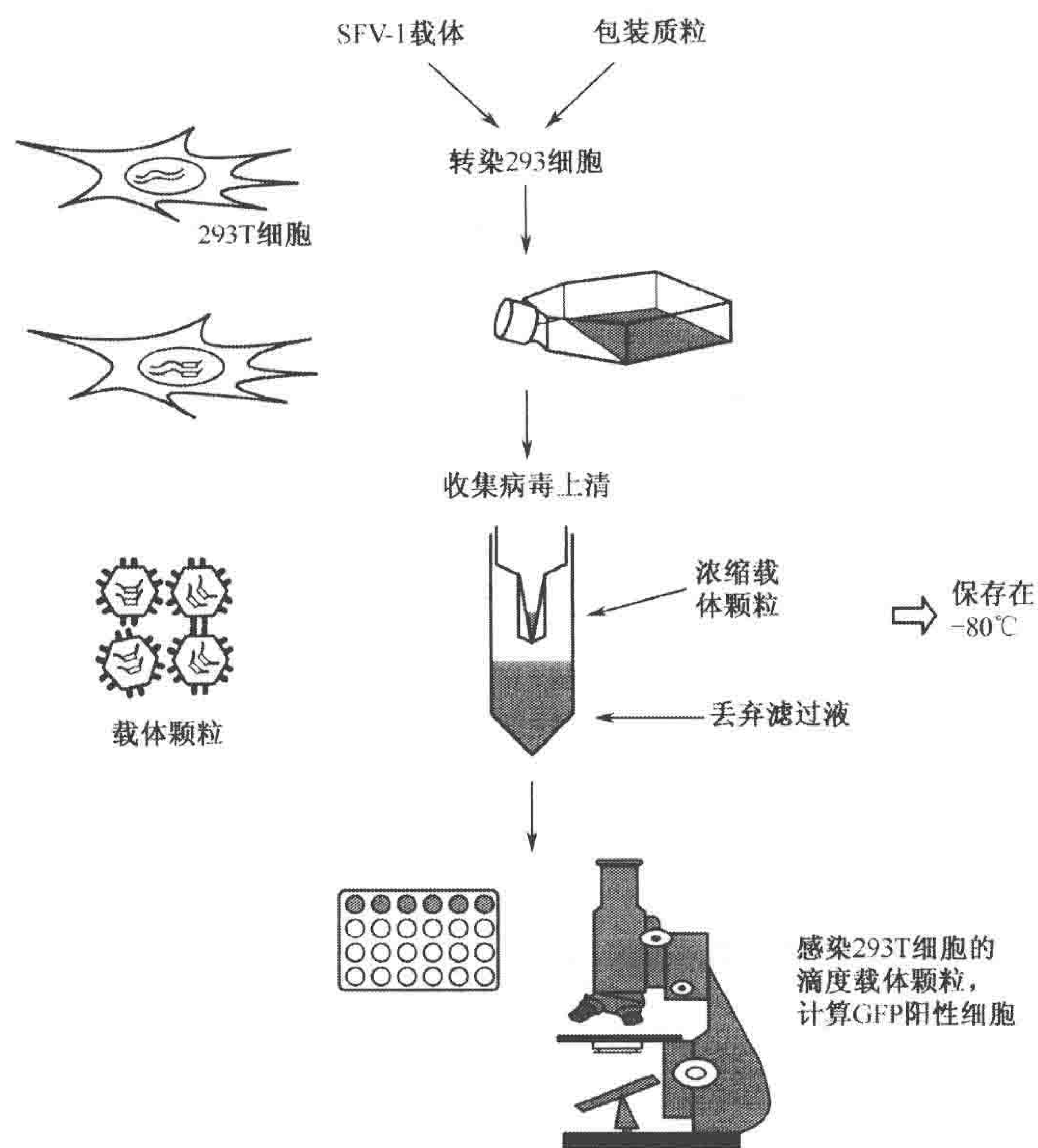



图 2. SFV-1 载体产生方案的概览。

## 材料

**注意**：标记<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

$CaCl_2$（2mol/L）<!>

氯喹（50mmol/L）<!>

完全 DMEM 培养基，含 10% FBS、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素<!>

胎牛血清（FBS）

2×HEPES 缓冲液（HBS；50mmol/L HEPES、0.78mmol/L $Na_2HPO_4$<!>和 273mmol/L NaCl）

Hank 平衡盐溶液（HBSS）

人类胚肾纤维原细胞来源的 293T 细胞

每隔 3～4d，将细胞以 1∶5 传代。293T 细胞从 ATCC 获得（CRL1573）。

质粒

包装质粒 pCIgag、pCIpol 和 pCIenv，分别含结构基因 *gag*、*pol* 和 *env*（图 1C-3）

SFV-1 载体 pCCGL（图 1B）含绿色荧光蛋白（GFP）表达框，用于监控转导效率。

用 QIAGEN 质粒提取试剂盒纯化所有的转染用质粒。

丁酸钠（1mol/L）

胰酶-EDTA

0.05%胰酶

0.53mmol/L EDTA 溶于 HBSS

## 仪器

Apollo 离心浓缩棒（70kDa；Orbital Bioscience，Topsfield，Massachusetts）

培养瓶（$25cm^2$ 和 $75cm^2$）

滤器（0.45μm，无菌包装，低蛋白质结合力，Millex-HV，Millipore）

倒置荧光显微镜

注射器（10ml）

组织培养板（6 孔和 24 孔）

离心管（conical，15ml 和 50ml）

离心管（1.5ml，螺丝帽；Sarstedt）

# 方法

## 用磷酸钙沉淀法转染 DNA

1. 转染前一天，每个 $75cm^2$ 培养瓶接种 $5\times10^6$ 个细胞。

   转染当天，细胞密度应达到 80%汇合。

2. 用 2.634ml（2634μl）$H_2O$ 稀释 12μg SFV-1 载体、12μg pCIgag、6μg pCIpol、2μg pCIenv。

   用超纯水（autoclaved，Millipore）。

3. 加 366μl 2mol/L $CaCl_2$ 至 DNA 混合物并混匀。加 3ml 2×HBS 到 DNA-$CaCl_2$ 混合液，室温放置 10min。
4. 制备 25μmol/L 氯喹溶液：加 4μl 50mmol/L 氯喹到 6ml 完全 DMEM 培养基中。用 6ml 这种氯喹溶液替换培养基。
5. 用枪头混合 DNA-$CaCl_2$-HBS 溶液，并产生 10s 的气泡，然后立即加到细胞中。
6. 孵育 6～8h 后，弃掉培养基，用含 10mmol/L 丁酸钠的完全培养基代替。

   丁酸钠处理不应超过 24h，丁酸钠能增加载体产量（Tanaka et al. 1991）。

## 病毒载体的收集和浓缩

7. 第二天早晨，用 6.5ml 含 3mmol/L 丁酸钠的新鲜完全培养基替换培养基。

至少 80%的细胞应表达 GFP，可以直接从一个倒置荧光显微镜观察到。通常在转染 4～5d 后收集上清。

8. 确定载体滴度：感染新鲜的 293T 细胞，计算 GFP 阳性细胞。

   通常，能产生 $10^7$ 个/ml 的 SFV-1 载体颗粒。载体能在 4℃保存 2 周而不会有明显损失。冻融一次会导致载体浓度丢失 10 倍。

9. 为了增加转导效率，用离心柱将 SFV-1 上清浓缩 100 倍。将病毒上清以 4000 *g* 离心 20min，除掉细胞碎片，用 0.45μm 的滤膜过滤。

10. 将过滤后的上清加到 70kDa 的 Apollo 离心柱，室温离心 30min。病毒可在 4℃短期保存，或－80℃长期保存。

## 致谢

发展 SFV-1 载体系统的研究得到了 NIH 的资助（AI39126）。

## 参考文献

Baldwin D.N. and Linial M.L. 1998. The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human FV. *J. Virol.* **72:** 3658–3665.

Baunach G., Maurer B., Hahn H., Kranz M., and Rethwilm A. 1993. Functional analysis of human FV accessary reading frames. *J. Virol.* **67:** 5411–5418.

Bodem J., Lochelt M., Winkler I., Flower R.P., Delius H., and Flugel R.M. 1996. Characterization of the spliced *pol* transcript of feline foamy virus: The splice acceptor site of the *pol* transcript is located in *gag* of foamy viruses. *J. Virol.* **70:** 9024–9027.

Callahan M.E., Switzer W.M., Matthews A.L., Roberts B.D., Heneine W., Folks T.M., and Sandstrom P.A. 1999. Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact *orf-2* accessory gene. *J. Virol.* **73:** 9619–9624.

Campbell M., Renshaw-Gegg L., Renne R., and Luciw P.A. 1994. Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses. *J. Virol.* **68:** 4811–4820.

Enssle J., Fischer N., Moebes A., Mauer B., Smola U., and Rethwilm A. 1997. Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J. Virol.* **71:** 7312–7317.

Fischer N., Heinkelein M., Lindemann D., Enssle J., Baum C., Werder E., Zentgraf H., Muller J.G., and Rethwilm A. 1998. Foamy virus particle formation. *J. Virol.* **72:** 1610–1615.

Flugel R.M., Rethwilm A., Maurer B., and Darai G. 1987. Nucleotide sequence analysis of the *env* gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes. *EMBO J.* **6:** 2077–2084.

Hahn H., Gerald B., Brautigam S., Mergia A., Neumann-Haefelin D., Daniel M.D., McClure M.O., and Rethwilm A. 1994. Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *J. Gen. Virol.* **75:** 2635–2644.

Heinkelein M., Leurs C., Rammling M., Peters K., Hanenberg H., and Rethwilm A.A. 2002. Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J. Virol.* **76:** 10069–10073.

Heneine W., Switzer W.M., Sandstrom P., Brown J., Vedapuri S., Schable C.A., Khan A.S., Lerche N.W., Schweizer M., Neumann-Haefelin D., Chapman L.E., and Folks T.M. 1998. Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat. Med.* **4:** 403–407.

Herchenroder O., Turek R., Neumann-Haefelin D., Rethwilm A., and Schneider J. 1995. Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology* **214:** 685–689.

Herchenroder O., Renne R., Loncar D., Cobb E.K., Murthy K.K., Schneider J., Mergia A., and Luciw P.A. 1994. Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): High homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201:** 187–199.

Hill C.L., Bieniasz P.D., and McClure M.O. 1999. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J. Gen. Virol.* **80:** 2003–2009.

Jordan M., Schalhorn A., and Wurm F.W. 1996. Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24:** 596–601.

Josephson N.C., Vassilopoulos G., Trobridge G.D., Priestley G.V., Wood B.L., Papayannopoulou T., and Russell D.W. 2002. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 8295–8300.

Keller A., Partin K.M., Lochelt M., Bannert H., Flugel R.M., and Cullen B.R. 1991. Characterization of the transcriptional *trans*-activator of human foamy virus. *J. Virol.* **65:** 2589–2594.

Leurs C., Jansen M., Pollok K.E., Heinkelein M., Schmidt M., Wissler M., Lindemann D., Kalle C.V., Rethwilm A., Williams D.A., and Hanenberg H. 2003. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34$^+$ cord blood cells. *Hum. Gene Ther.* **10:** 509–519.

Lochelt M. 2003. Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **277:** 27–61.

Lochelt M., Flugel R.M., and Aboud M. 1994. The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 and Bet protein early after infection. *J. Virol.* **68:** 638–645.

Lochelt M., Muranyi W., and Flugel R.M. 1993. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 7317–7321.

Lochelt M., Zentgraf H., and Flugel R.M. 1991. Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the *bel1* gene. *Virology* **184:** 43–54.

Maurer B. and Flugel R.M. 1988. Genomic organization of the human spumaretrovirus and its relatedness to AIDS and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **4:** 467–473.

Meiering C.D. and Linial M.L. 2002. Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 15130–15135.

Mergia A. 1994. Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3′ end of the *env* gene. *Virology* **199:** 219–222.
Mergia A. and Wu M. 1998. Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J. Virol.* **72:** 817–822.
Mergia A., Leung N.J., and Blackwell J. 1996. Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J. Med. Primatol.* **25:** 2–7.
Mergia A., Shaw K.E.S., Pratt-Lowe E., Barry P.A., and Luciw P.A. 1991. Identification of the simian foamy virus transcriptional transactivator gene (*taf*). *J. Virol.* **65:** 2903–2909.
Muranyi W. and Flugel R.M. 1991. Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J. Virol.* **65:** 727–735.
Park J. and Mergia A. 2002. Simian foamy virus vectors: Preparation and use. In *Gene therapy protocols*, 2nd edition (ed. J.R. Morgan), pp. 319–333. Humana Press, Totowa, New Jersey.
Park J., Nadeau P.E., and Mergia A. 2002. A minimal genome simian foamy virus type 1 (SFV-1) vector system with efficient gene transfer. *Virology* **302:** 336–344.
Patton G.S., Erlwein O., and McClure M.O. 2004. Cell-cycle dependence of foamy virus vectors. *J. Gen. Virol.* **85:** 2925–2930.
Renne R., Mergia A., Renshaw-Gegg L.W., Neumanm-Haefelin D., and Luciw P.A. 1993. Regulatory elements in the long terminal repeat (LTR) of simian foamy virus type 3. *Virology* **192:** 365–369.
Renshaw R.W. and Casey J.W. 1994. Transcriptional mapping of the 3′ end of the bovine syncytial virus genome. *J. Virol.* **68:** 1021–1028.
Rethwilm A., Otto E., Baunach G., Maurer B., and Meulen V. 1991. The transcriptional transactivater of human foamy virus maps to the *bel1* genomic region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 941–945.
Schweizer M., Falcone V., Gange J., Turek R., and Neumann-Haefelin D. 1997. Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J. Virol.* **71:** 4821–4824.
Schweizer M., Turek R., Hahn H., Schliephake A., Netzer K.O., Eder G., Reinhardt M., Rethwilm A., and Neumann-Haefelin D. 1995. Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: Appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **11:** 161–170.
Tanaka J., Sadanari H., Sato H., and Fukuda S. 1991. Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology* **185:** 271–280.
Tobaly-Tapiero J., Bittoun P., Neves M., Guillemin M.C., Lecellier C.H., Puvion-Dutilleul F., Gicquel B., Zientara S., Giron M.L., de The H., and Saib A. 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J. Virol.* **74:** 4064–4073.
Trobridge G., Josephson N., Vassilopoulos G., Mac J., and Russell D.W. 2002. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther.* **6:** 321–328.
Trobridge G.D. and Russel D.W. 1998. Helper-free foamy virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2517–2525.
———. 2004. Cell cycle reqirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J. Virol.* **78:** 2327–2335.
Venkatesh L.K., Theodorakis P.A., and Chinnadurai G. 1991. Distinct *cis*-acting regions in the U3 regulate *trans*-activation of the human spumaretrovirus long terminal repeat by the viral *bel1* gene product. *Nucleic Acids. Res.* **19:** 3661–3666.
Winkler I., Bodem J., Haas L., Zemba M., Delius H., Flower R., Flugel R.M., and Lochelt M. 1997. Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses. *J. Virol.* **71:** 6727–6741.
Wolfe N.D., Switzer W.M., Carr J.K., Bhullar V.B., Shanmugam V., Tamoufe U., Prosser A.T., Torimiro J.N., Wright A., Mpoudi-Ngole E., McCutchan F.E., Birx D.L., Folks T.M., Burke D.S., and Heneine W. 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* **363:** 932–937.
Wu M. and Mergia A. 1999. Packaging cell lines for simian foam virus type 1 (SFV-1) vectors. *J. Virol.* **73:** 4498–4501.
Wu M., Chari S., Yanchis T., and Mergia A. 1998. *cis*-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 (SFV-1) vectors. *J. Virol.* **72:** 3451–3454.
Yu S.F., Sullivan M.D., and Linial M.L. 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* **73:** 1565–1572.
Yu S.F., Baldwin D.N., Gwynn S.R., Yendapalli S., and Linial M.L. 1996. Human foamy virus replication: A pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271:** 1579–1582.
Zucali J.R., Ciccarone T., Kelley V., Park J., Johnson C.M., and Mergia A. 2002. Transduction of umbilical cord blood $CD34^+$ NOD/SCID-repopulating cells by simian foamy virus type 1 (SFV-1) vector. *Virology* **302:** 229–335.

# 第十一章　VSV-G-假型反转录病毒载体的产生

Jiing-Kuan Yee

Division of Virology, Beckman Research Institute, City of Hope National Medical Center, Duarte, California 91010

易　翔　译



## 摘要

反转录病毒载体已越来越多地作为基因运载工具用于基础科研和人类疾病的治疗。病毒的外壳蛋白能识别细胞的表面受体，从而使细胞进入通常称之为载体系统的细胞取向性的状态。然而，用这个载体系统将基因运输进某些特殊类型的细胞并不总是很有效的，因为这些细胞表面或者没有受体表达，或者受体浓度很低。为了提高转导效率，一个叫假型形成的策略被采纳了，它是将反转录病毒颗粒与其他病毒编码的外壳蛋白相结合。因为这些假型载体颗粒用了不同的表面受体进入细胞，与含有原始的反转录病毒外壳蛋白的载体相比，它们能更有效地把转基因运输进哺乳动物细胞。如果受体有严格的组织分布，那么依靠外壳蛋白，它们也能够进行组织专一性的运输。这里，我们采用了水泡性口炎病毒（VSV）的糖蛋白（G）来说明如何在几天之内产生假型载体。假型慢病毒载体也通过相似的策略产生。用类似于这里提到的方法，除了 VSV-G，各种其他病毒编码的外壳蛋白也能用于结合反转录病毒或慢病毒载体。这些假型载体在不同的细胞类型中显示了不同程度的感染性，可以运输转基因进入不同的组织。

## 引言

反转录病毒载体被广泛用作基因运输工具来研究基因功能和治疗人类疾病。然而，应用该载体系统有许多局限性，包括不能转导非增殖细胞、对某些细胞类型感染力很弱和载体滴度太低。因为反转录病毒的宿主范围通常是由病毒编码的外壳蛋白和宿主细胞

表面受体的相互反应决定的，因此弱的感染力可能是由于特殊细胞类型中受体的浓度太低。弱的感染力要求产生更高的载体滴度来增加基因的运输效率。另外，直接体内运送基因也需要高滴度的载体制备物，因为体内给药通常会受到注射用溶液体积的局限。因为这些问题，通常会需要应用物理浓缩的步骤如离心来增加病毒滴度。然而，含有单嗜性或兼嗜性外壳蛋白的传统反转录病毒载体不能承受离心力，在这样的步骤后会失去感染性（Burns et al. 1993）。

假型的形成用于克服传统反转录病毒载体的局限性（Emi et al. 1991）。假型形成是基于在用 VSV、口炎病毒亚家族的成员和反转录病毒，如小鼠白血病病毒，混合感染细胞时观察到产生了可繁殖的病毒，该病毒拥有一个病毒的基因组和另一个病毒的外壳蛋白（Zavada 1972；Huang et al. 1973；Love and Weiss 1974）。假型形成的精确机制目前还不清楚。然而，假型病毒颗粒通过病毒颗粒的外壳蛋白而改变了宿主范围。MLV 与 VSV-G 蛋白结合后拥有与 VSV 相似的宿主范围。CHO 细胞易受 VSV 感染，但难以受 MLV 感染。然而，VSV-G 假型化的 MLV 能高效地感染 CHO 细胞（Emi et al. 1991）。这种感染是由于在 MLV 颗粒中存在 VSV-G 蛋白，因为针对 VSV-G 的抗体能抵消感染性。VSV-G 假型反转录病毒载体的宿主范围甚至扩展到了非哺乳动物种类包括来自于昆虫、蟾蜍和鱼类的细胞（Lin et al. 1994；Burns et al. 1996；Matsubara et al. 1996）。这说明哺乳动物反转录病毒跨种族感染的主要障碍是细胞表面受体的可接近性。VSV-G 的受体还未确认，但相信该受体在不同种族间是广泛分布的，因为 VSV 有相当宽的宿主范围。除了能扩展宿主范围之外，VSV-G 假型化的 MLV 比含兼嗜性外壳蛋白的同样载体能更有效地转导哺乳动物细胞（Emi et al. 1991）。VSV 能承受离心力，能浓缩到高滴度（Burns et al. 1993）。与 VSV 相似，VSV-G-假型 MLV 载体能浓缩超过 1000 倍。这允许载体滴度到达超过 $10^9$ 个感染颗粒/ml，使得体内运输基因到哺乳动物模型变得可行。总之，VSV-G 假型增加了 MLV 载体感染哺乳动物细胞的感染力，允许载体浓缩到高滴度以便体内给药。

通过 4 步流程可产生 VSV-G 假型 MLV 载体：①构建一个含感兴趣的基因的 MLV 载体；②从瞬时转染的 293T 细胞中产生和收集载体；③载体纯化和浓缩；④滴度确定。这里，我们用一个含编码绿色荧光蛋白的基因（GFP）的 MLV 载体与 VSV-G 形成假型说明该过程。MLV 与其他外壳蛋白的假型化能通过相似的方法产生。整个过程依赖于人类胚肾细胞 293T 极高的转染效率和表达高水平的腺病毒 E1A、E1B 和空泡病毒 40（SV40）大 T 抗原（Pear et al. 1993）。在最优化的条件下，用磷酸钙共沉淀方法转染这种细胞系转染率能超过 90%。用其他更有效率的方法如脂质体转染这种细胞系则没有必要。在载体构建方面，修饰 5′长末端重复（LTR）被用于最大化载体产量。该修饰基于观察到腺病毒 E1A 蛋白能抑制 MLV LTR 增强子活性，而刺激巨细胞（CMV）瞬时早期（IE）基因增强子活性（Naviaux et al. 1996）。MLV 的 5′LTR 增强子被去掉，含 TATA 框的启动子与 CMV 增强子融合（图 1，pPY-1）。因为 MLV 3′LTR的结构完整无缺，这种修饰不会影响载体整个基因组的结构。

不同的实验室构建了大量反转录病毒载体以适合基因插入。这些载体最重要的特征是 CMV IE 增强子与 MLV 5′LTR 的启动子融合可以有效地从 293T 细胞产生假型载体。pCL 载体系统提供 4 个这样的含 *neo* 基因的 MLV 载体（Naviaux et al. 1996）。转

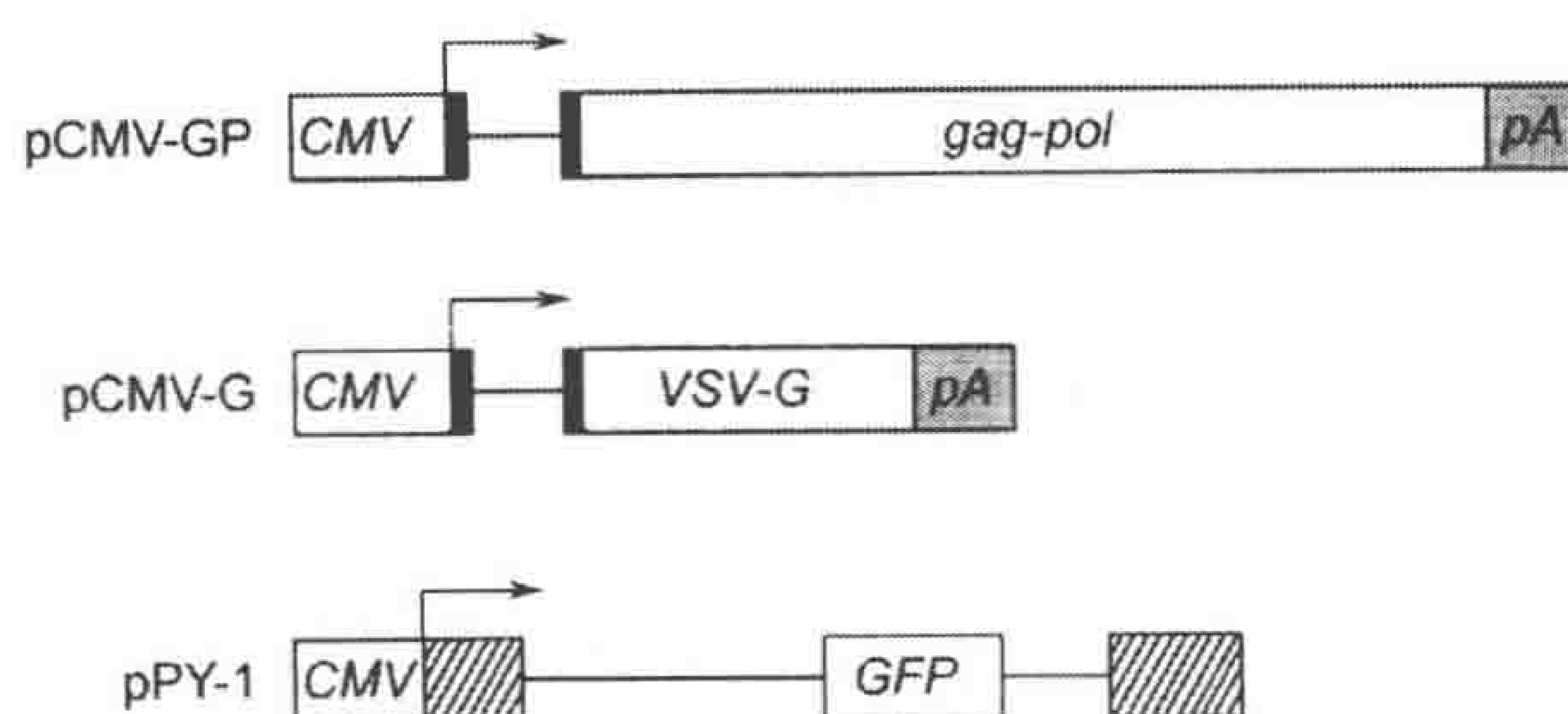



图 1. VSV-G 假型化载体的包装系统。pCMV-GP 和 pCMV-G 中黑框和连接两个黑框的水平线代表β-球蛋白外显子（黑框）和内显子（水平线）序列。箭头显示转录起始位点和转录方向。pPY-1 的斜线框代表 MLV LTR。pCMV-GP 和 pCMV-G 中的 CMV 表示 CMV IE 启动子和增强子，而 pPY-1 中的 CMV 仅代表 CMV IE 增强子。pA 表示从β-球蛋白基因来的多聚腺苷酸。

基因被放置在 5′LTR 或 3 个选择的内部启动子其中之一的转录调控下（图 2A）。复制起始的 SV40 插入到包装质粒，外壳蛋白表达质粒和在转染细胞中扩增这些 DNA 的载体。在 293T 细胞中共表达 SV40T 抗原显著地增加了转染质粒的拷贝数。然而，载体的滴度没有随之增加，说明细胞产生感染载体的能力达到饱和（Naviaux et al. 1996）。图 1 中含 GFP 的 pPY-1 反转录病毒载体起源于 pCMV-LL-SA-2，含延伸的 *gag* 区域和来自于 MLV 的拼接信号（图 2B）（Peng et al. 2001）。延伸的 *gag* 区域允许更有效地包装载体基因组，MLV 拼接信号导致转基因的表达增强。与 pCL 系统相似，在 pCMV-LL-SA-2 5′LTR 端的 MLV 增强子被 CMV 增强子替换以增加 293T 细胞载体的产量。

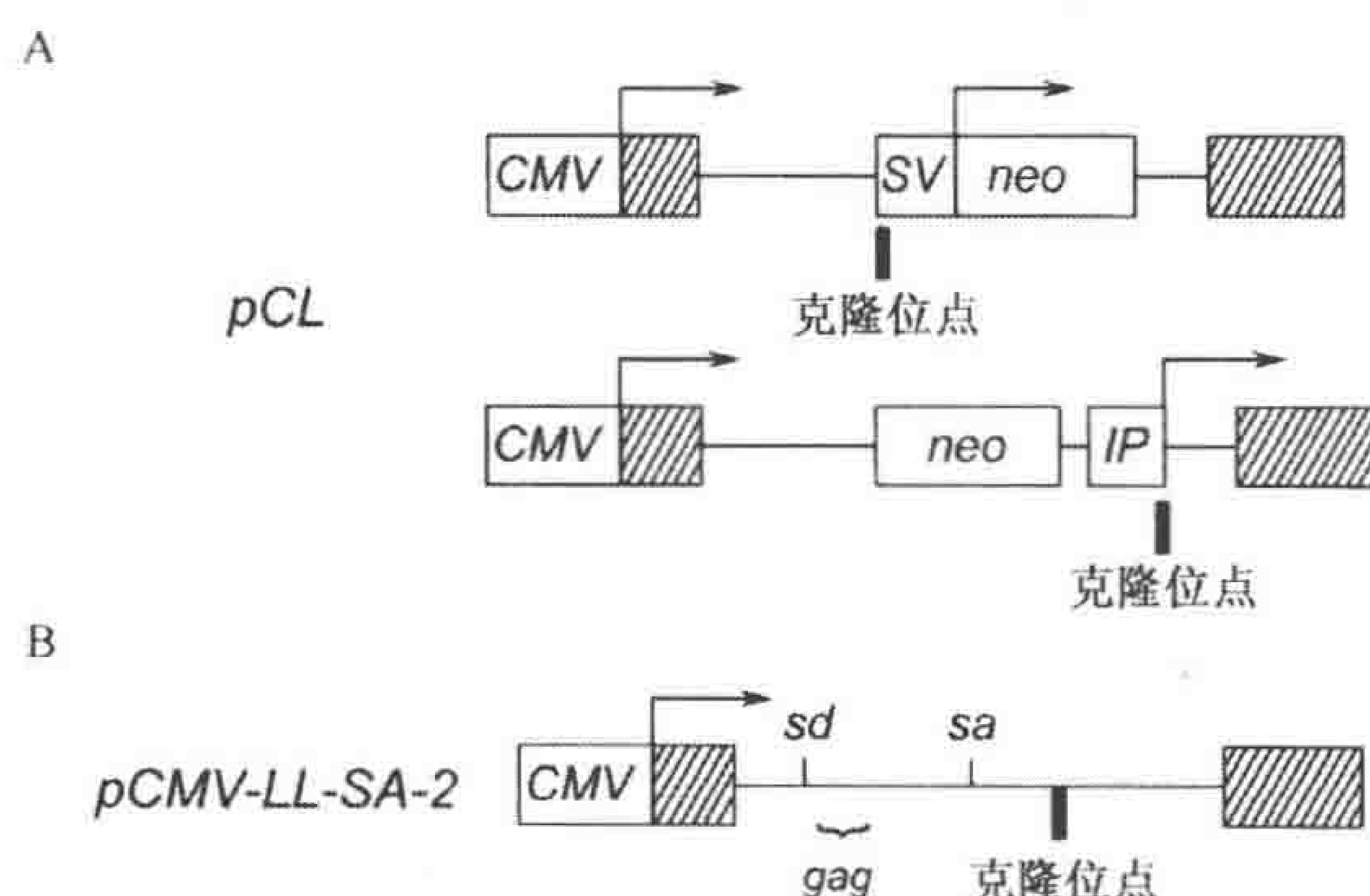



图 2. MLV 载体的结构，箭头表示转录起始位点和转录方向。每个载体中的转基因多克隆位点标注。CMV 代表 CMV IE 增强子。A. pCL 系统载体，SV 表示 SV40 早期启动子，IP 表示内源启动子包括 CMV IE 启动子、Rous sarcoma 病毒 LTR 或二氢叶酸还原酶启动子；B. pCMV-LL-SA-2 的结构，延伸的 *gag* 区域，*sd* 和 *sa* 表示 MLV 的拼接供体和受体位点。

在载体产生方面，构建好的载体与包装质粒 pCMV-GP、VSV-G 表达质粒 pCMV-G 共转染进 293T 细胞（图 1）。pCMV-GP 中的 *gag* 和 *pol* 基因，pCMV-G 中的 VSV-

G 基因都在强劲的 CMV IE 启动子的转录调控下在 293T 细胞中最大限度地表达。将载体产生系统分开到 3 个不同的质粒中最小化了通过 DNA 重组产生具有复制能力的反转录病毒（RCR）的风险。另外，构建的载体和 pCMV-G 能直接转染进能稳定表达高水平的 MLV *gag* 和 *pol* 蛋白的基于 293 的包装细胞系。其中一个细胞系，GP2-293 被 BD 公司实现了商业化。在 293T 细胞中过表达 VSV-G 蛋白使细胞脱落和产生毒性（Burns et al. 1993）。因此，在细胞完全脱落之前就应收集具有感染性的载体。收集的载体通过聚乙二醇纯化步骤（PEG）除去细胞裂解时的可能的毒性物质。该步骤也能 10～30 倍地浓缩载体滴度，因为很少的溶液体积被用于重悬 PEG 沉淀的载体。纯化步骤相对较快，能大幅度地减少载体制备过程中的毒性物质。超速离心用于浓缩 VSV-G 假型 MLV 载体而得到高滴度以便直接体内给药。通常在人的纤维肉瘤细胞系 HT1080 或 293T 细胞中进行滴度确定。这两个细胞系培养增殖快，能有效地转导 MLV。用含 GFP 基因的载体转导细胞 3～7d 后，可以用流式细胞仪（FACS）评估。由 GFP 蛋白与假型颗粒共包装引起的假转导会产生假阳性细胞（Liu et al. 1996），在进行流式分析之前，延长转导细胞的培养时间（转导后 7d 而不是 3d）会获得更准确的滴度评估。假如载体含一个选择性的标签如编码潮霉素磷酸转移酶的基因（*neo*），那么 GFP 就不是问题了。在这种情况下，转导后的细胞受 G418 筛选至少 2 周，滴度用克隆形成来评估。

与 VSV-G 形成假型并没有解决 MLV 载体不能转导非增殖细胞的问题。相反，慢病毒载体能转导静息细胞，VSV-G 能有效地结合慢病毒颗粒（Naldini et al. 1996）。VSV-G 假型的慢病毒载体能通过同样的流程产生、纯化和浓缩。

与反转录病毒形成假型的不仅仅限于 VSV-G 蛋白。MLV 载体能与长臂猿白血病病毒（GALV）的外壳蛋白形成假型（Miller et al. 1991）。这样一个假型载体与一个相似的，但和兼嗜性外壳蛋白假型化的载体相比，能更有效地将转基因运送进狒狒骨髓和造血祖细胞中（Kiem et al. 1997）。感染力的提升与造血干细胞中 GALV 受体表达水平更高的结果相一致。有人报道 MLV 载体分别与来自猫内源病毒（FEV）RD114、MLV 10A1、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）的外壳蛋白形成假型（Takeuchi et al. 1992；Miller and Chen 1996；Miletic et al. 1999）。因为这些病毒利用不同的表面受体进入细胞，因此可以预计这些假型的细胞易感性是不一样的。和与兼嗜性外壳蛋白形成的载体相比，与 RD114 外壳蛋白形成假型的 MLV 载体能更有效地转导人类脐带血 $CD34^+$ 细胞（Kelly et al. 2000）。然而，当用狗的 $CD34^+$ 细胞作为靶细胞时，用 RD114 或 GALV 外壳蛋白假型化的 MLV 载体的转染效率并没有区别（Goerner et al. 2001）。用 MLV 10A1 外壳蛋白假型化的 MLV 载体转导人类 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞时，比与 GALV、RD114 或兼嗜性外壳蛋白形成假型的同样的载体更有效率（Gladow et al. 2000；Uckert et al. 2000）。在这种情况下，10A1 假型在培养基中相对长的半衰期可能会导致转导效率增加。这些假型承受离心力的能力也有变化。与 RD114 或 LCMV 形成假型的 MLV 载体能通过超速离心浓缩，而与兼嗜性或 GALV 外壳蛋白形成假型的载体在离心步骤中会丢失感染性。

也有人报道能通过假型形成得到有严格组织取向的 MLV 载体。仙台病毒融合蛋白（SV-F）能专一性地结合肝糖蛋白受体，介导病毒外壳与细胞膜的融合。SV-F 与 MLV

颗粒形成的假型能专一性地转导肝细胞（Spiegel et al. 1998）。这些研究清楚地说明，MLV 假型能通过广谱的病毒外壳蛋白形成。然而，这些假型的感染滴度会依据外壳蛋白与 MLV 颗粒结合的效率而变化。每个假型的感染性依赖于细胞表面受体的可接近性、受体浓度、外壳蛋白与受体的亲和力、假型在溶液中的稳定性。

因为通过瞬时转染而过表达 VSV-G 会诱导严重的细胞毒性，因此很难建立一个稳定的包装细胞系来大量制造 VSV-G 假型化的 MLV 载体。用四环素诱导系统调节 VSV-G 表达，建立了两个以 293 为基础的 MLV 包装细胞系（Chen et al. 1996；Ory et al. 1996）。不诱导时，仅能检测到本底水平的 VSV-G 表达，细胞在培养中持续增殖。在非诱导的条件下，任何 MLV 载体都能运进这些细胞系，并确立稳定的载体产生细胞系。在诱导条件下，这些细胞能产生滴度在 $10^5$～$10^6$ 个感染颗粒/ml 的 MLV 载体。而且，瞬时转染产生的感染性假型载体仍然适合细胞培养工作和动物模型研究，因为这些诱导的包装细胞系的增殖会因为剩余的 VSV-G 表达而延迟，稳定生产细胞系的建立是乏味和漫长的。而来自 GALV 或 RD114 的外壳蛋白形成的假型载体就没什么问题，因为这些蛋白质通常是无毒性的。持续释放这种假型颗粒的稳定的生产细胞系很容易建立。

## 方案

# 产生 VSV-G-假型化的反转录病毒载体

该方案描述了如何利用 VSV-G 在几天之内产生假型病毒载体。最终的载体扩大其宿主范围到与 VSV 类似。VSV-G 与反转录颗粒的结合也增加了载体的稳定性，允许通过一些简单的方案使载体纯化和浓缩，以得到高滴度的载体制备物。

## 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

$CaCl_2$ 2mol/L

溶解 29.41g 的 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 到 100ml $H_2O$，无菌过滤。

细胞

293T（ATCC：CRL-11268）

HT1080（ATCC：CRL-121）

DMEM 含 4.5g/L 葡萄糖、3.7g/L $NaHCO_3$、2mmol/L L-谷氨酰胺、100mg/L 庆大霉素

乙醇（100%）

胎牛血清（FBS）

2×HBS

在 180ml $H_2O$ 中溶解 2.38g HEPES、3.28g NaCl、42.4mg $Na_2HPO_4$＜！＞，调 pH 至

7.12，加水到200ml，无菌过滤。

乳糖溶液（4%）

在100ml PBS中溶解4g α-乳糖一水化物（Sigma-Aldrich），无菌过滤。

PEG 8000（40%；Sigma-Aldrich）

100ml PBS中溶解40g PEG，室温搅拌过夜，然后高压灭菌，4℃保存。

磷酸盐缓冲溶液（PBS）

在800ml $H_2O$中溶解8g NaCl、0.2g KCl、1.44g $Na_2HPO_4$、0.24g $KH_2PO_4$，调pH至7.4，补$H_2O$至1L，高压灭菌。

质粒

包装质粒：pCMV-GP

VSV-G表达质粒：pCMV-G

聚凝胺（4mg/ml溶于PBS；Sigma-Aldrich）

含GFP基因或药物筛选标记的反转录病毒载体

TE79/10

1mmol/L Tris（pH7.9）

0.1mmol/L EDTA

无菌过滤。

### 仪器

Acrodisc注射器滤器

用0.45μm低蛋白质结合力的滤器（Pall Gelman laboratory，Ann Arbor，Michigan）。

离心机（Beckman Allegra 6 tabletop）PTS-2000转头

培养皿（100mm）

Eppendorf thermomixer R mixer（Eppendorf，Westbury，New York）

流式细胞仪（FACS）

注射器（10ml）

DNA转染用管（12mm×75mm聚苯乙烯）

离心管（超速离心，25mm×89mm；Ultra-Clear，Beckman Coulter）

超速离心机（Beckman Coulter）SW28转头

## 方法

### 载体产生

1. 在100mm培养皿上接种$2\times10^6$个293T细胞，完全DMEM/10% FBS，培养细胞过夜。

   293T细胞传代时间大约20h，这种细胞系在2个月内能保持很高的转染效率。然而，细胞生长超过3个月会突然丧失产生载体的能力。因此不要培养细胞超过3个月。

2. 用10ml新鲜培养基更换旧的培养基，继续在$CO_2$孵育箱中培养细胞1～2h（见疑难解答）。

293T 细胞增殖很快。在转染当天更换培养基以确保培养基有最优的 pH 以有效转染。转染时细胞密度应达到 70%汇合度。低的细胞密度会减少载体滴度。有人在 80%汇合度的细胞密度时转染，能产生高滴度的载体。更高的细胞密度不仅能增加载体的产量，而且也能延长载体收集的时段，因为细胞在高密度时能更好地抗 VSV-G 诱导的细胞分离。

3. 按如下准备新鲜的转染溶液：
   a. 在 12mm×75mm 聚苯乙烯管中混合 15μg 的 pPY-1、15μg 的 pCMV-GP、2μg 的 pCMV-G。
   b. 加 TE79/10 溶液至总体积 437μl。
   c. 加 63μl 2mol/L $CaCl_2$，混匀。
   d. 逐滴加 500μl 2×HBS 溶液，并不停搅拌。
   e. 室温孵育 30min，以便磷酸钙和 DNA 形成沉淀。

   30min 孵育后磷酸钙沉淀应形成，溶液变混浊。如未观察到，用新鲜的转染溶液重复沉淀步骤。2×HBS 溶液的 pH 是转染成功的最关键因素。如溶液的 pH 在储存过程中发生变化，则应换用新的溶液。

   VSV-G 对哺乳动物细胞有毒性，增加 pCMV-G 转染的量会导致载体滴度的降低。这会导致转染的 293T 细胞因为 VSV-G 的过表达而在成熟前死亡。因此，在载体产生中应保持 pCMV-G 的量最低。

4. 将 DNA 沉淀加入步骤 1、2 准备的 293T 细胞中混匀，在培养皿上再孵育 5～6h，用 6ml 新鲜的培养基代替并孵育过夜。

   用 6ml 培养基（而不是 10ml），是为了减少收集的载体体积以便接下来的载体纯化和浓缩步骤。

5. 在 DNA 转染 24、40、48、64 和 72h 后从同一个培养皿中收集含载体的培养基。每次收集时，用 6ml 新鲜培养基替换，以便下次的载体收集。

   新鲜培养基应小心地沿着培养皿的边缘加，因为转染和 VSV-G 表达的毒性会导致细胞容易脱落。

   VSV-G 过表达诱导的细胞毒性会变得越来越明显。转染后 72h，大多数细胞会从培养皿上脱落。假如在该时间点上没有观察到细胞毒性如台孢体形成或细胞脱落，转染可能已经失败了，可以预计载体滴度会很低。

6. 将培养基在 PTS-2000 转头，Beckman Allegra 6 tabletop 离心机中室温 2500r/min 离心 5min。收集上清，用 0.45μm 的注射器过滤。载体立即－80℃保存直到纯化步骤。

## 载体纯化

7. 溶解粗提的载体制备物，与 40%的 PEG 储液混合，使 PEG 终浓度达 10%。
8. 将 PEG-载体混合物置于冰上 4h，或冰箱放过夜。

   在 PEG 中的载体非常稳定：在 4℃可保存 1 周，感染滴度丢失很少。

   收集的载体能直接超速离心而不用 PEG 纯化。但是，得到的载体比 PEG 纯化后的载体在不同的细胞类型中更容易引起细胞毒性。因此极力推荐 PEG 步骤。

9. 将载体在 PTS-2000 转头，Beckman Allegra 6 tabletop 离心机中 3000r/min 离心 30min。

10. 用含4%乳糖的PBS或10%FBS的DMEM重悬载体。用1/10或1/30的原始体积收集重悬载体。

部分纯化后的载体可直接用于转导或继续超速离心得到更高滴度的载体制备。在重悬溶液中加乳糖或FBS能在保存时稳定MLV载体。含重悬载体的溶液通常是混浊的，因为里面有残余的PEG。增加重悬液的体积能减少混浊度。但是，残余的PEG不会影响细胞转导。保存中残余的PEG似乎能稳定载体。延长−80℃保存的时间基本不会使载体丢失感染性，而与未进行PEG处理的载体相比，多次冻融对载体滴度影响要小得多。通过将PEG纯化前后的载体制备物进行凝胶电泳和银染发现PEG沉淀去掉了大量污染的细胞蛋白质。从条带浓度上看，超过95%的FBS通过该步骤被除去。在滴度方面，该步骤的载体回收率很高（80%～100%）。

### 载体浓缩

11. 用100%乙醇将Ultra-Clear超速离心管（25mm×89mm）、适配器、SW28转头的螺帽消毒，在层流罩中空气干燥。
12. 将PEG纯化的载体制备物转移到无菌的超速离心管中，加PBS或DMEM到37ml。
13. 将载体在SW28转头，Beckman Coulter超速离心机中4℃，25 000r/min离心90min。
14. 弃上清，在层流罩中反转离心管几分钟以除去液体。加0.5～1ml 4%乳糖或DMEM重悬载体。
15. 4℃，在Eppendorf thermomixer R mixer中以800r/min，将载体在乳糖溶液或DMEM中振荡3～4h（见疑难解答）。

重悬的载体溶液是混浊的，因为有残余的PEG。如载体在DMEM中重悬，补加10%FBS。载体制备物存储在−80℃。

### 滴度确定

16. HT1080以$2\times10^6$个接种在100mm培养皿上，加完全培养基DMEM/10%FBS。另外准备一个培养皿第二天进行细胞计数。细胞培养过夜。
17. 一个培养皿消化并计数，另一个培养皿用含4μg/ml的聚凝胺的新鲜培养基替换旧培养基。用DMEM稀释浓缩的载体，加到HT1080培养皿中，孵育过夜。
18. 用新鲜的无聚凝胺的培养基替换，继续孵育过夜。
19. 消化细胞，离心，用1ml DMEM/10%FBS重悬，进行流式分析。
20. 计算载体滴度（感染性的颗粒/ml）：

转导当天的总细胞数×FACS确定的$GFP^+$细胞百分比×载体稀释因子（见疑难解答）

如果滴度确定中用了药物选择性标记，每100mm培养皿中$2\times10^5$个HT1080细胞，因为当细胞活跃增殖时选择性最有效。如果细胞在培养皿中汇合，需要其他选择来消除非转导的背景。

## 疑难解答

问题（步骤2）：更换培养基时293T细胞很容易从培养皿上脱落。

解决方法：因此不推荐 DNA 转染后立即更换培养基。继续培养细胞 1～2h，使细胞紧密地贴附培养皿。

问题（步骤 15）：有 FBS 的 DMEM 在搅拌时起沫，会导致病毒感染滴度的明显丢失。

解决方法：载体重悬后再加 FBS。

问题（步骤 15）：想通过离心使载体溶液变澄清，却导致感染性滴度明显丢失。

解决方法：在大多数情况下，混浊不会干扰感染性，当细胞用该载体转导时不会观察到明显的细胞毒性。

问题（步骤 20）：由于 293T 细胞产生载体时 GFP 蛋白与病毒颗粒共组装，所以使用 GFP 标记时会发生假转导现象。GFP 蛋白释放入已转导的 HT1080 细胞中会产生假阳性细胞。用 AZT 处理细胞可以从载体转运的转基因中消除“真”表达，但不能阻止假转导发生。

解决方法：为了避免高估 GFP 的滴度，转导后 7～8d 再分析 FACS 以最小化假型转导的影响。在选择 HT1080 细胞时，新霉素和潮霉素使用浓度为 400～600μg/ml（活性成分）。

## 致谢

我们感谢 David Hsu 博士关于载体纯化和浓缩的建议。

## 参考文献


Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8033–8037.

Burns J.C., McNeill L., Shimizu C., Matsubara T., Yee J.K., Friedmann T., Kurdi-Haidar B., Maliwat E., and Holt C.E. 1996. Retrovirol gene transfer in *Xenopus* cell lines and embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **32:** 78–84.

Chen S.T., Iida A., Guo L., Friedmann T., and Yee J.K. 1996. Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 10057–10062.

Emi N., Friedmann T., and Yee J.K. 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **65:** 1202–1207.

Gladow M., Becker C., Blankenstein T., and Uckert W. 2000. MLV-10A1 retrovirus pseudotype efficiently transduces primary human CD4⁺ T lymphocytes. *J. Gene Med.* **2:** 409–415.

Goerner M., Horn P.A., Peterson L., Kurre P., Storb R., Rasko J.E., and Kiem H.P. 2001. Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34⁺ marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood* **98:** 2065–2070.

Huang A.S., Besmer P., Chu L., and Baltimore D. 1973. Growth of pseudotypes of vesicular stomatitis virus with N-tropic murine leukemia virus coats in cells resistant to N-tropic viruses. *J. Virol.* **12:** 659–662.

Kelly P.F., Vandergriff J., Nathwani A., Nienhuis A.W., and Vanin E.F. 2000. Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* **96:** 1206–1214.

Kiem H.P., Heyward S., Winkler A., Potter J., Allen J.M., Miller A.D., and Andrews R.G. 1997. Gene transfer into marrow repopulating cells: Comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* **90:** 4638–4645.

Lin S., Gaiano N., Culp P., Burns J.C., Friedmann T., Yee J.K., and Hopkins N. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* **265:** 666–669.

Liu M.L., Winther B.L., and Kay M.A. 1996. Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)–Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: Comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J. Virol.* **70:** 2497–2502.

Love D.N. and Weiss R.A. 1974. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus determined by exogenous and endogenous avian RNA tumor viruses. *Virology* **57:** 271–278.

Matsubara T., Beeman R.W., Shike H., Besansky N.J., Mukabayire O., Higgs S., James A.A., and Burns J.C. 1996. Pantropic retroviral vectors integrate and express in cells of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 6181–6185.

Miletic H., Bruns M., Tsiakas K., Vogt B., Rezai R., Baum C., Kuhlke K., Cosset F.L., Ostertag W., Lother H., and von Laer D. 1999. Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **73:** 6114–6116.

Miller A.D. and Chen F. 1996. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* **70:** 5564–5571.

Miller A.D., Garcia J.V., von Suhr N., Lynch C.M., Wilson C., and Eiden M.V. 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **65:** 2220–2224.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Naviaux R.K., Costanzi E., Haas M., and Verma I.M. 1996. The pCL vector system: Rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* **70:** 5701–5705.

Ory D.S., Neugeboren B.A., and Mulligan R.C. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11400–11406.

Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L., and Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8392–8396.

Peng H., Chen S.T., Wergedal J.E., Polo J.M., Yee J.K., Lau K.H., and Baylink D.J. 2001. Development of an MFG-based retroviral vector system for secretion of high levels of functionally active human BMP4. *Mol. Ther.* **4:** 95–104.

Spiegel M., Bitzer M., Schenk A., Rossmann H., Neubert W.J., Seidler U., Gregor M., and Lauer U. 1998. Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F. *J. Virol.* **72:** 5296–5302.

Takeuchi Y., Simpson G., Vile R.G., Weiss R.A., and Collins M.K. 1992. Retroviral pseudotypes produced by rescue of a Moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses. *Virology* **186:** 792–794.

Uckert W., Becker C., Gladow M., Klein D., Kammertoens T., Pedersen L., and Blankenstein T. 2000. Efficient gene transfer into primary human CD8$^+$ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Hum. Gene Ther.* **11:** 1005–1014.

Zavada J. 1972. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses. *J. Gen. Virol.* **15:** 183–191.

# 第十二章　用表面修饰的慢病毒载体转运靶基因

Els Verhoeyen 和 François-Loïc Cosset

INSERM，U412，Lyon，F-69007 France；Ecole Normale Supérieure de Lyon，Lyon，F-69007 France；IFR128 BioSciences Lyon-Gerland，Lyon，F-690007 France

易　翔　译



## 摘要

来自反转录病毒的载体，如慢病毒和致癌反转录病毒特别适合于长期基因转运，因为它们允许稳定整合转基因和在子细胞中增殖。慢病毒载体优于源自致癌反转录病毒的载体，如小鼠白血病病毒（MLV）载体，因为它们能转导非增殖靶细胞。而且，慢病毒载体能够特异性地靶向组织，可用于体内各种基因的转运。为了实现靶基因的转运，对慢病毒载体做了两类表面修饰：①利用其他病毒的定向性，结合异源病毒糖蛋白（称之为假型）；②异源的多肽与病毒糖蛋白融合使得慢病毒颗粒能重新靶向感兴趣的细胞。本章提供一个提升慢病毒载体组织靶向性的新颖的方法，以及一个靶向转导造血干细胞（HSC）的示例方案。

## 引言

### 用糖蛋白的天然取向进行宿主范围修饰

反转录病毒来源的载体对基因运送给药特别有用，因为病毒表面糖蛋白的许多可能结合性，能决定病毒核心的细胞取向（Negre et al. 2002）。MLV 兼嗜性链的外壳糖蛋白用于人类免疫缺陷病毒来源载体的早期实验中（Naldini et al. 1996）。但是它的受体 Pit-2 基因治疗的重要靶标，在造血干细胞中的含量很低。相反，将水泡性口炎病毒（VSV）-G 糖蛋白与慢病毒核心结合产生的假型载体有广泛的取向性，能整合进非增殖靶细胞包括造血干细胞（Naldini et al. 1996）。而且，这些假型能抗冻融循环和超速离

心，这是基因运输载体的两个重要质量标准。这些载体的确有缺陷，例如，一些体内基因转移给药需要载体在系统给药后有靶向专一性（Peng et al. 2001）。因为 VSV-G 受体是质膜的一个脂质成分，因此分布广泛（Seganti et al. 1986）。VSV-G 假型接种后能结合到所有的细胞表面，而不仅仅是靶细胞。而且，VSV-G 假型载体能被人类血清迅速失活（DePolo et al. 2000）。这些性质限制了 VSV-G 糖蛋白在体内基因运输中的应用。

通过利用从其他膜包装病毒糖蛋白的自然取向能够获得更多的选择性取向。例如，用能导致肺感染和通过呼吸道上皮细胞感染的病毒表面糖蛋白（如埃博拉病毒或流行性感冒病毒）已证明对人类呼吸道基因治疗有效（Kobinger et al. 2001）。在大鼠眼中视网膜接种假型病毒载体是唯一能转导视网膜上皮的方法（Duisit et al. 2002）。同样的，通过大量的假型载体筛选已经建立了用长臂猿白血病病毒（GALV）和猫内源性反转录糖蛋白（RD114），转导祖系和分化的造血干细胞的方法（Porter et al. 1996；Marandin et al. 1998；Movassagh et al. 1998；Kelly et al. 2000；Hanawa et al. 2002；Sandrin et al. 2002）。

共表达给定的糖蛋白和异源的病毒核心不会产生高感染性的病毒颗粒。GALV 和 RD114 慢病毒假型就能说明这个问题（Takeuchi et al. 1992；Lindemann et al. 1997；Mammano et al. 1997；Schnierle et al. 1997；Stitz et al. 2000；Christodoulopoulos and Cannon 2001；Sandrin et al. 2002）。

与 GALV 和 RD114 糖蛋白产生的猿猴免疫缺陷病毒（SIV）载体之所以没有感染性，是因为糖蛋白和慢病毒核心的结合有缺陷。事实上，用 MLV-A 糖蛋白替换 RD114 和 GALV 糖蛋白会大大增加其结合性（Stitz et al. 2000；Christodoulopoulos and Cannon 2001；Sandrin et al. 2002）。这些嵌合糖蛋白 GALV 和 RD114（即 GALV/TR 和 RD114/TR）保留了原始糖蛋白的宿主范围，与 SIV 载体与野生型糖蛋白形成的假型相比滴度增加了 25 倍。与 GALV/TR 和 RD114/TR 假型化的慢病毒载体能够转导 $CD34^+$ 细胞是因为细胞能短暂耐受同时用病毒和细胞因子处理，而 MLV 载体则不行。而且，RD114/TR 假型化的 SIV 载体相对于与 VSV-G 和 MLV-A 糖蛋白组成的假型载体能非常有效地转导人类和猕猴 T 淋巴细胞。该差别可能是由于这些糖蛋白的受体在细胞表面的表达差异而造成的。然而，有几篇报道说，转导效率与受体表达水平无关（Uckert et al. 1998；Goerner et al. 2001），而是依赖于结合后的事件，如受体簇、膜融合、融合位点、病毒颗粒解包装、病毒颗粒从解包装的位点向核的迁移（Rodrigues and Heard 1999；Lavillette et al. 2001）。

## 重定向的工程化反转录糖蛋白

反转录外壳糖蛋白能忍受一系列遗传编码修饰。早期的反转录病毒取向工程化包括在病毒表面糖蛋白的几个位点插入不同的配型，如生长因子、激素、多肽或单链抗体。这些修饰通过使病毒结合与其受体不同的人类细胞表面分子而改变了病毒颗粒的宿主范围。某些情况下（Battini et al. 1998；Lorimer and Lavictoire 2000），可通过结构信息将选择性的插入片段优化（Linder et al. 1992，1994；Fass et al. 1997）。这些修饰包括：①区域替换（Kasahara et al. 1994；Benedict et al. 1999；Barnett et al. 2001）；②在不折叠的区域插入多肽（Valsesia-Wittmann et al. 1994；Battini et al. 1998；Wu et

al. 1998，2000；Gollan and Green 2002)；③折叠区域的多肽展示（Russell et al. 1993；Cosset et al. 1995；Valsesia-Wittman et al. 1996，1997；Buchholz et al. 1998；Fielding et al. 1998，2000；Chadwick et al. 1999；Kayman et al. 1999；Maurice et al. 1999，2002；Martin et al. 2002)。许多嵌合糖蛋白能正确折叠，稳定地与病毒颗粒结合，能高效地将病毒颗粒重新靶向预期的细胞表面分子。但是替换嵌合外壳糖蛋白的 N 端，则病毒结合水平很低或几乎测不到，这可能是因为糖蛋白不能很好地折叠、装配并且运输到细胞表面造成的。与未修饰的糖蛋白共表达这样的嵌合体似乎能增强它们的结合（Chu et al. 1994；Kasahara et al. 1994；Matano et al. 1995)，它们需要异质低聚化合物帮助来正确加工、转运到细胞表面和载体颗粒结合。

### 通过专一性的配体-受体结合直接靶向

直接靶向的策略是基于一个简单的理念嵌合外壳的融合激活会被展示的配体和它在靶细胞表面的专一性受体的相互作用而激活。在实践中，这个概念获得了有限的成功。尽管大多数的配体展示的外壳糖蛋白有效而专一性地结合到了它们的靶细胞，但相应病毒颗粒的感染性很弱。这些载体的弱感染性是由重新靶向反转录糖蛋白和受体的基本性质决定的：①它们不能诱导膜融合和将病毒核心渗透进细胞质；②通过细胞表面分子螯合靶向受体结合的反转录病毒颗粒。

展示多肽对骨架外壳糖蛋白的影响不是总能预料到的。即使用区域间隔优化嵌合糖蛋白的结合和融合区域（如文献 Ager et al. 1996；Valsesia-Wittmann et al. 1996，1997)，这样的假型载体的滴度仍然很低。

### 间接靶向

间接靶向策略限制了载体的宿主范围属性。宿主范围限定是通过修饰外壳糖蛋白破坏载体感染非靶向细胞的能力而达到的。这些策略的重要优势是利用病毒的天然进入通道使融合激活嵌合糖蛋白更加容易。发展了两个不同的靶向策略：逆向靶向和蛋白酶靶向。

逆向靶向是一个间接的靶向策略，它利用受体介导的病毒中和（Fielding et al. 1998)。C 型反转录病毒外壳糖蛋白 N 端的展示配体会抑制表达靶受体的细胞感染性（Cosset et al. 1995；Nilson et al. 1996；Chadwick et al. 1999；Fielding et al. 1998，2000)。最初观察到展示表皮生长因子（EGF）的兼嗜性载体能有效地结合 EGF 受体阳性靶细胞但不能感染它们（Cosset et al. 1995)。EGF 展示载体能有效地感染 EGF 受体阴性的造血干细胞，却不能感染 EGF 受体阳性的上皮癌细胞。相反地，干细胞因子（SCF）展示载体不能感染 c-kit 阳性的造血干细胞，却能有效地感染 c-kit 阴性的上皮癌细胞。因此，展示 EGF 或 SCF 的反转录病毒载体在组织培养中能有效地区别造血和非造血细胞。逆向靶向可用于选择性地转导携带抗细胞毒性药物治疗的转基因。在这种情况下，逆向靶向的作用是可以最小化转导能表达大量 EGF 受体的癌细胞的污染。

蛋白酶靶向可利用一些靶细胞中表达的细胞表面受体的螯合性质（Peng et al. 1997，1998，1999；Chadwick et al. 1999；Martin et al. 1999，2002)。该策略依赖于一个分子装置使载体从螯合受体中逃逸。这可以通过在展示的病毒螯合配体和病毒糖

蛋白间插入一个可被细胞表面专一性的蛋白酶切割的多肽底物来实现。感染分两步进行。首先，载体通过展示的结合区域与细胞黏附。第二步，接头锚定结合区域，糖蛋白被蛋白酶切割。背后的糖蛋白暴露，与靶细胞天然的病毒受体作用，促进病毒的进入(Nilson et al. 1996)。

三个不同的策略利用蛋白酶切割的接头靶向反转录病毒载体进入特定的细胞。第一个策略，受体结合区域 EGF 作为 MLV 外壳糖蛋白可切割的延伸展示在反转录病毒载体上。与该嵌合糖蛋白假型化的载体在基因转运到 EGF 受体阳性的靶细胞中被阻止，可能是因为病毒螯合到细胞表面受体不能支持病毒的进入 (Nilson et al. 1996; Buchholz et al. 1998; Peng et al. 1999; Schneider et al. 2003; Hartl et al. 2005)。EGF 受体阳性细胞分泌基质金属蛋白酶 (MMP) 激活 MMP 敏感载体。然而，该策略有局限性，因为它需要在靶细胞中存在 EGF 受体，在受体阴性的细胞中感染力不会受损，反而会减少专一性靶向。

第二个策略，聚多肽 (如 CD40 配体) 融合到 MLV 糖蛋白的 N 端，不论受体是什么表型，都因为空间位阻阻止其与 MLV 受体结合，从而阻断对细胞的感染性(Morling et al. 1997)。位于多肽和外壳糖蛋白间的蛋白酶位点能被靶细胞的蛋白酶切割，使载体具有感染性。该策略极大地破坏了基因转移载体结合，在蛋白酶激活后可能导致非专一性的靶向周围细胞。

与这些依赖于异源阻碍区域的策略相比，最近报道了利用来自于一些有广泛取向的包装病毒的表面糖蛋白的未切割形式 (如流感病毒的血凝素 HA)，在 postbinding 阶段天然状态下就能阻断感染。HA 进入细胞的属性是通过替换掉 HA1 表面和 HA2 转膜亚单位的异源蛋白酶底物 (JSzé csi et al. 未发表)。载体颗粒锚定这些工程化的 HA 糖蛋白不能诱导基因转运到不表达相应蛋白酶的细胞中，除非被 HA1/HA2 消化激活。这样的载体能够轻易地感染肿瘤细胞，表达细胞表面偶联的 MMP，导致与 MMP 少量细胞相比，能多转运 200 倍的转基因。在含 MMP 丰富或少的混合细胞群中，这些载体导致 50 倍转染率。这些结果为用专一蛋白酶活性靶向肿瘤细胞提供了可能性。而其他的靶向方法依赖异源多肽有条件的阻止感染，无所不在地表达 HA 受体，唾液酸确保锚定修饰的 HA 糖蛋白的载体颗粒有效地被所有靶细胞俘获，非靶细胞中则完全没有病毒进入。

这些结果提供了如下可能性，细胞表面蛋白酶，而不是受体，能用于靶向基因的运输，因为许多蛋白酶在细胞表面或近于细胞表面表达。原则上，加入能确定一个专一性和有效性的切割，任何不降解外壳糖蛋白的蛋白酶都能用该策略靶向。

## 护送病毒进入

正如上面所讨论的，直接的靶向策略仅仅当结合和激活外壳融合机制是偶联时才是有用的。共表达野生型的糖蛋白与第二种护送糖蛋白也允许将病毒颗粒结合到丰富表达靶分子的组织中。第二种糖蛋白带有细胞专一性的结合力，常常有融合缺陷。这些策略称之为选择性靶向策略，导致优先 (而不是仅仅) 感染靶细胞。本质上，这样的方法不会有很高的专一性，因为辅助病毒受体的广泛分布会导致转导的细胞缺乏靶向的细胞表面分子。

### 载体介导的靶细胞激活

另一个间接靶向策略依赖于展示在载体表面的配体与其专一性受体的相互作用会诱导靶细胞的信号刺激。专一性的刺激显著地增强了基因转运到靶细胞。这个概念首先是通过兼嗜性 MLV 反转录病毒载体其糖蛋白经工程化能展示肝生长因子（HGF）和干扰素 2（IL-2）而提出的。这样的载体能感染初级肝细胞（Nguyen et al. 1998）或 IL-2 依赖的细胞（Maurice et al. 1999），而这些细胞很难用未修饰外壳糖蛋白的载体转运。因为 MLV 载体需要细胞分裂以整合，很明显，增加的靶细胞转导水平被激活细胞周期和病毒颗粒与这些细胞的相互作用而激活（Maurice et al. 1999）。

尽管慢病毒载体能在体内和体外转导非增殖细胞，且有些细胞类型是重要的基因治疗靶标，但它们却抗基因转运。这些细胞包括早期的 $G_0$ 期 HSC 祖细胞（Sutton et al. 1999）、单细胞（Kootstra et al. 2000；Neil et al. 2001）、静息的 T 细胞（Dardalhon et al. 2001）。为了克服不能转导非活性 T 细胞的问题，构建了能展示 T 细胞激活多肽的 HIV-1 载体颗粒。这些颗粒在感染时能靶向和刺激 T 细胞。一个来自抗 CD3 OKT3 单克隆抗体的单链可变片段（scFv），能识别和激活 T 细胞受体，融合到 MLV 外壳糖蛋白表面亚基的 N 端。该嵌合体，CD3 靶向的 MLV 糖蛋白感染性很低，所以共表达护送的野生型 VSV-G 外壳蛋白是慢病毒颗粒具有完全感染性所必需的。该载体的刺激能增加淋巴细胞的基因转运率到 48%，比未修饰的慢病毒载体高 100 倍（Maurice et al. 2002）。然而，研究显示，转导的幼 T 细胞会表型修饰到记忆细胞中。因此，想转导静息 T 细胞又保持其表型（Soares et al. 1998；Webb et al. 1999），可将人类 IL-7 基因融合到 MLV 外壳糖蛋白的 N 端。IL-7 展示的慢病毒载体允许有效地转导幼 $CD4^+$ T 细胞和记忆 $CD4^+$ T 细胞，转导率达 40%，并保持幼 T 细胞的功能性质（Verhoeyen et al. 2003）。

目前慢病毒载体的另一个主要限制是不能有效地转基因进入处在 $G_0$ 期的人类 $CD34^+$ 细胞，包括大量 HSC。为了克服该限制，设计了新型的慢病毒载体在其表面能展示早期活跃的细胞因子。展示血小板素（TPO）、SCF 或细胞因子在慢病毒的表面允许有效地转基因到静息脐带血 $CD34^+$ 细胞（Verhoeyen et al. 2005）。这些表面工程化的慢病毒载体优先转导进入静息 $CD34^+$ 细胞，而不是周期细胞。重要的是，与传统的慢病毒载体相比，它们能转运大多数的不成熟 $CD34^+$ 细胞，甚至后期的载体在有重组生长因子存在下可用于转导细胞。这显示了它们在体外长期培养起始细胞（LTC-IC）和体内长期非肥胖性糖尿病/重症联合免疫缺陷（NOD/SCID）复检细胞中的转导能力。

**方案**

## 用表面工程慢病毒载体靶向造血干细胞

这里提到的靶向性策略，是用能展示 HSC 激活多肽、SCF 和 TPO 的载体特异性地转导造血干细胞。靶向造血干细胞的转导用 NOD/SCID 小鼠模型评估。

### 材料

**注意**：标有＜ !＞的材料的处理方法见附录。

## 试剂

293T 细胞

抗 CD34 藻红蛋白抗体（BD Pharmingen）

Calphos 哺乳动物转染试剂盒用于磷酸钙介导的转染（Clontech）

Cellgro 培养基（无血清培养基；Cellgenix）

DMEM 培养基含有 0.11g/L 吡哆醇钠和维生素 $B_6$

　DMEM 中补充 10%胎牛血清、100μg/ml 链霉素＜!＞、100U/ml 青霉素、4℃储存。

胎牛血清（FCS，无菌）

Ficoll-Paque Plus（无菌；Amersham）

HeLa 细胞

造血干细胞（HSC；按如下方法从新生儿脐带血中纯化）

　许多研究显示 HSC 存在于表达 $CD34^+$ 抗原的细胞群中。脐带血中大约 1%的单核细胞是 $CD34^+$。

NOD/SCID 小鼠

核酸

　慢病毒载体 DNA 编码一个 HIV-1 来源的自失活载体带有内在的 EF1-α 启动子驱动绿色荧光蛋白（GFP）报道基因。

　外壳糖蛋白表达质粒

　　融合糖蛋白 VSV-G

　　激活并靶向造血干细胞的糖蛋白：①TPOHA（TPO 融合 HA 外壳糖蛋白）；②SCFSUx（SCF 融合 MLV 外壳糖蛋白）。

　病毒结构蛋白（Gag-Pol）表达质粒（pCMV8.91）

　神经氨酸酶表达质粒 pCMV-NA

磷酸盐缓冲液（PBS），无钙镁，无碳酸氢钠，无菌

消化试剂

　胰酶＜!＞/EDTA

　1×Hank 平衡盐溶液（HBSS），无钙镁，无菌

## 仪器

$CD34^+$ 细胞分离试剂盒从 Miltenyi 含抗人类 CD34 微珠和阻断试剂

滤膜（0.45μm）

流式系统能分选细胞和三色分析

流式管

MACS 细胞分离柱（Miltenyi Biotec）

MACS 分离器（Miltenyi Biotec）

标准组织培养试剂，包括 100mm、6 孔和 48 孔组织培养板

## 方法

### 产生能展示活性多肽的慢病毒载体

1. 0天：转染前一天，接种 $2.5\times10^{6}$ 个293T细胞在100mm组织培养皿，10ml DMEM培养。
2. 1天：用磷酸钙转染试剂共转染 8.6μg HIV 包装质粒和 8.6μg 慢病毒基因转运载体和两个糖蛋白：VSV-G（1.5μg）和 TPOHA（1.5μg）。

   共转染 TPOHA 和编码神经氨酸酶的质粒，允许从生产细胞中有效地释放病毒。否则，载体颗粒将通过 HA 外壳和唾液酸受体的相互反应来结合生产细胞。
3. 2天：转染后15h，用6ml新鲜 Cellgro 培养基替换培养基。

   该培养基适于培养 $CD34^{+}$ 细胞和允许细胞因子展示在载体表面以保持功能。
4. 3天：转染后36h，收集载体，用0.45μm膜过滤，保存在−80℃。

   载体能储存2～3个月。

### 人类 $CD34^{+}$ 细胞的免疫选择

5. 用 PBS 1∶1 稀释脐带血（CB），在50ml管中轻柔地将35ml稀释血置于15ml Ficoll-Paque Plus 之上。
6. 20℃，850*g* 离心细胞30min，不刹车。收集含单核细胞的层。

   单核细胞是位于 Ficoll 层顶部的白色的带。
7. 用 PBS 和 2% FCS 洗涤收集的单核细胞，20℃，850*g* 离心10min。
8. 用 PBS 和 2% FCS 以 $1\times10^{8}$～$2\times10^{8}$ 个的浓度重悬细胞。根据制造商的指导加抗人类 $CD34^{+}$ 微磁珠使细胞带有磁性。4℃孵育并振动30min。
9. 洗细胞去除未结合的抗体，用 PBS/2% FCS 重悬细胞。
10. 用200μl PBS/2% FCS 洗 MACS 分离柱。将标记细胞加到柱子上并放在 MACS 分离器里。允许未标记细胞通过柱子。用 PBS/2% FCS 洗一次。从分离器上移除柱子以洗脱 $CD34^{+}$ 细胞。重复该步骤一次。

    $CD34^{+}$ 细胞的纯度通常是90%～95%。

### 滴度确定

11. 前一天：以 $2\times10^{5}$ 个/孔将 HeLa 细胞接种在6孔板中，终体积2ml DMEM/孔。孵育过夜。
12. 0天：加一系列稀释的载体制备物到 HeLa 细胞中并孵育过夜。
13. 1天：用2ml新鲜 DMEM 替换细胞培养基，孵育72h。
14. 3天：消化细胞转到流式管。通过流式确定 GFP 阳性细胞的百分率。

    感染滴度表达为转导单位（TU）/ml，通过如下公式计算：

    滴度＝%GFP 阳性细胞（感染时的细胞数/100）×稀释倍数

    多重感染度（moi）是感染性颗粒与靶细胞数的比例

## 人类 CD34$^+$ 细胞转导

15. 以 $5\times10^4$ 个/孔在 48 孔板中接种 CD34$^+$ CB 细胞，CellGro 培养基。以 20 或 4 的多重感染度转导新鲜的慢病毒载体上清。孵育 24h。
16. 用 CellGro 培养基洗涤和重悬转导的细胞。孵育 48h。用抗 CD34-PE 抗体免疫标记细胞，通过流式分析 GFP 表达以确定转导效率。

## NOD/SCID 复检

17. 转导 TPOHA 展示、SCFSUx 展示的慢病毒载体 24h 后，为静脉注射非致死性的放射性（3.5Gy）CD34$^+$ CB 细胞到没有体内细胞因子给药的 NOD/SCID 小鼠。
18. 移植后 6～8 周后从股骨收集骨髓。
19. 在 NOD/SCID 骨髓中用抗-hCD45-CyChrome、抗-hCD19-PE、抗-hCD14-PE、抗-hCD13-PE 和抗-hCD34-PE 抗体，应用三色流式检测不同种系的 GFP$^+$ 人类细胞。在所有的情况下，PE 偶联的小鼠 IgG 对照应用于评估专一性标记。

## 参考文献


Ager S., Nilson B.H.K., Morling F.J., Peng K.W., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1996. Retroviral display of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity. *Hum. Gene Ther.* **7:** 2157–2164.

Barnett A.L., Davey R.A., and Cunningham J.M. 2001. Modular organization of the Friend murine leukemia virus envelope protein underlies the mechanism of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 4113–4118.

Battini J.L., Danos O., and Heard J.M. 1998. Definition of a 14-amino-acid peptide essential for the interaction between the murine leukemia virus amphotropic envelope glycoprotein and its receptor. *J. Virol.* **72:** 428–435.

Benedict C.A., Tun R.Y., Rubinstein D.B., Guillaume T., Cannon P.M., and Anderson W.F. 1999. Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: Binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion. *Hum. Gene Ther.* **10:** 545–557.

Buchholz C.J., Peng K.-W., Morling F.J., Zhang J., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1998. In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries. *Nat. Biotechnol.* **16:** 951–954.

Chadwick M.P., Morling F.J., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1999. Modification of retroviral tropism by display of IGF-I. *J. Mol. Biol.* **285:** 485–494.

Christodoulopoulos I. and Cannon P. 2001. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J. Virol.* **75:** 4129–4138.

Chu T.H., Martinez I., Sheay W.C., and Dornburg R. 1994. Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene Ther.* **1:** 292–299.

Cosset F.-L., Morling F.J., Takeuchi Y., Weiss R.A., Collins M.K., and Russell S.J. 1995. Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J. Virol.* **69:** 6314–6322.

Dardalhon V., Herpers B., Noraz N., Pflumio F., Guetard D., Leveau C., Dubart-Kupperschmitt A., Charneau P., and Taylor N. 2001. Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene Ther.* **8:** 190–198.

DePolo N.J., Reed J.D., Sheridan P.L., Townsend K., Sauter S.L., Jolly D.J., and Dubensky T.W. 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* **2:** 218–122.

Duisit G., Conrath H., Saleun S., Folliot S., Provost N., Cosset F.-L., Sandrin V., Moullier P., and Rolling F. 2002. Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol. Ther.* **6:** 446–454.

Fass D., Davey R.A., Hamson C.A., Kim P.S., Cunningham J.M., and Berger J.M. 1997. Structure of a murine leukemia virus receptor-binding glycoprotein at 2.0 angstrom resolution. *Science* **277:** 1662–1666.

Fielding A.K., Maurice M., Morling F.J., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1998. Inverse targeting of retroviral vectors: Selective gene transfer in a mixed population of hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* **91:** 1802–1809.

Fielding A.K., Chapel-Fernandes S., Chadwick M., Bullough F., Cosset F.-L., and Russell S. 2000. A hyperfusogenic Gibbon ape leukemia virus envelope glycoprotein: Targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Hum. Gene Ther.* **11:** 817–826.

Goerner M., Horn P.A., Peterson L., Kurre P., Storb R., Rasko J.E., and Kiem H.P. 2001. Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34$^+$ marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood* **98:** 2065–2070.

Gollan T.J. and Green M.R. 2002. Redirecting retroviral tropism by insertion of short, nondisruptive peptide ligands into envelope. *J. Virol.* **76:** 3558–3563.

Hanawa H., Kelly P.F., Nathwani A.C., Persons D.A., Vandergriff J.A., Hargrove P., Vanin E.F., and Nienhuis A.W. 2002. Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. *Mol. Ther.* **5:** 242–251.

Hartl I., Schneider R.M., Sun Y., Medvedovska J., Chadwick M.P., Russell S.J., Cichutek K., and Buchholz C.J. 2005. Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells. *Gene Ther.* **12:** 918–926.

Kasahara N., Dozy A.M., and Kan Y.W. 1994. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* **266:** 1373–1376.

Kayman S.C., Park H., Saxon M., and Pinter A. 1999. The hypervariable domain of the murine leukemia virus surface protein tolerates large insertions and deletions, enabling development of a retroviral particle display system. *J. Virol.* **73:** 1802–1808.

Kelly P., Vandergriff J., Nathwani A., Nienhuis A., and Vanin E. 2000. Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency

repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* **96:** 1206–1214.

Kobinger G.P., Weiner D.J., Yu Q.C., and Wilson J.M. 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19:** 225–230.

Kootstra N.A., Zwart B.M., and Schuitemaker H. 2000. Diminished human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and nuclear transport in primary macrophages arrested in early $G_1$ phase of the cell cycle. *J. Virol.* **74:** 1712–1717.

Lavillette D., Boson B., Russell S., and Cosset F.-L. 2001. Membrane fusion by murine leukemia viruses is activated in *cis* or in *trans* by interactions of the receptor-binding domain with a conserved disulfide loop at the carboxy-terminus of the surface glycoproteins. *J. Virol.* **75:** 3685–3695.

Lindemann D., Bock M., Schweizer M., and Rethwilm A. 1997. Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* **71:** 4815–4820.

Linder M., Wenzel V., Linder D., and Stirm S. 1994. Structural elements in glycoprotein 70 from polytropic Friend mink cell focus-inducing virus and glycoprotein 71 from ecotropic Friend murine leukemia virus, as defined by disulfide-bonding pattern and limited proteolysis. *J. Virol.* **68:** 5133– 5141.

Linder M., Linder D., Hahnen J., Schott H.H., and Stirm S. 1992. Localization of the intrachain disulfide bonds of the envelope glycoprotein 71 from Friend murine leukemia virus. *Eur. J. Biochem.* **203:** 65–73.

Lorimer I.A. and Lavictoire S.J. 2000. Targeting retrovirus to cancer cells expressing a mutant EGF receptor by insertion of a single chain antibody variable domain in the envelope glycoprotein receptor binding lobe. *J. Immunol. Methods* **237:** 147–157.

Mammano F., Salvatori F., Indraccolo S., de Rossi A., Chieco-Bianchi L., and Göttlinger H.G. 1997. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4$^+$ cells. *J. Virol.* **71:** 3341–3345.

Marandin A., Dubart A., Pflumio F., Cosset F.-L., Cordette V., Chapel-Fernandes S., Coulombel L., Vainchenker W., and Louache F. 1998. Retroviral-mediated gene transfer into human CD34$^+$/38$^-$ primitive cells capable of reconstituting long-term cultures in vitro and in nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice in vivo. *Hum. Gene Ther.* **9:** 1497–1511.

Martin F., Chowdhury S., Neil S., Phillipps N., and Collins M.K. 2002. Envelope-targeted retrovirus vectors transduce melanoma xenografts but not spleen or liver. *Mol. Ther.* **5:** 269–274.

Martin F., Neil S., Kupsch J., Maurice M., Cosset F.-L., and Collins M. 1999. Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J. Virol.* **73:** 6923–6929.

Matano T., Odawara T., Iwamoto A., and Yoshikura H. 1995. Targeted infection of a retrovirus bearing a CD4-Env chimera into human cells expressing human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **76:** 3165–3169.

Maurice M., Verhoeyen E., Salmon P., Trono D., Russell S.J., and Cosset F.-L. 2002. Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* **99:** 2342–2350.

Maurice M., Mazur S., Bullough F.J., Salvetti A., Collins M.K.L., Russell S.J., and Cosset F.-L. 1999. Efficient gene delivery to quiescent IL2-dependent cells by murine leukemia virus-derived vectors harboring IL2 chimeric envelopes glycoproteins. *Blood* **94:** 401–410.

Morling F.J., Peng K.W., Cosset F.L., and Russell S.J. 1997. Masking of retroviral envelope functions by oligomerizing polypeptide adaptors. *Virology* **234:** 51–61.

Movassagh M., Desmyter C., Baillou C., Chapel-Fernandes S., Guigon M., Klatzmann D., and Lemoine F.M. 1998. High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum. Gene Ther.* **9:** 225–234.

Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Nègre D., Duisit G., Mangeot P.-E., Moullier P., Darlix J.-L., and Cosset F.-L. 2002. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261:** 53–74.

Neil S., Martin F., Ikeda Y., and Collins M. 2001. Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J. Virol.* **75:** 5448–5456.

Nguyen T., Pages J.-C., Farge D., Briand P., and Weber A. 1998. Amphotropic retroviral vectors displaying hepatocyte growth factor-envelope fusion proteins improve transduction efficiency of primary hepatocytes. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2469–2479.

Nilson B.H.K., Morling F.J., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1996. Targeting of retroviral vectors through protease-substrate interactions. *Gene Ther.* **3:** 280–286.

Peng K.W., Morling F.J., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1998. A retroviral gene delivery system activatable by plasmin. *Tumor Targeting* **3:** 112–120.

Peng K.-W., Vile R.G., Cosset F.-L., and Russell S.J. 1999. Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors. *Gene Ther.* **6:** 1552–1557.

Peng K.W., Morling F.J., Cosset F.-L., Murphy G., and Russell S.J. 1997. A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Hum. Gene Ther.* **8:** 729–738.

Peng K.W., Pham L., Ye H., Zufferey R., Trono D., Cosset F.-L., and Russell S.J. 2001. Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Ther.* **8:** 1456–1463.

Porter C.D., Collins M.K.L., Tailor C.S., Parker M.H., Cosset F.-L., Weiss R.A., and Takeuchi Y. 1996. Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Hum. Gene Ther.* **7:** 913–919.

Rodrigues P. and Heard J.M. 1999. Modulation of phosphate uptake and amphotropic murine leukemia virus entry by posttranslational modifications of PIT-2. *J. Virol.* **73:** 3789–3799.

Russell S.J., Hawkins R.E., and Winter G. 1993. Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res.* **21:** 1081–1085.

Sandrin V., Boson B., Salmon P., Gay W., Nègre D., LeGrand R., Trono D., and Cosset F.-L. 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34$^+$ cells derived from human and non-human primates. *Blood* **100:** 823–832.

Schneider R.M., Medvedovska Y., Hartl I., Voelker B., Chadwick M.P., Russell S.J., Cichutek K., and Buchholz C.J. 2003. Directed evolution of retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases. *Gene Ther.* **10:** 1370–1380.

Schnierle B.S., Stitz J., Bosch V., Nocken F., Merget-Millitzer H., Engelstadter M., Kurth R., Groner B., and Cichutek K. 1997. Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 8640–8645.

Seganti L., Superti F., Girmenia C., Melucci L., and Orsi N. 1986. Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica* **9:** 259–267.

Soares M.V., Borthwick N.J., Maini M.K., Janossy G., Salmon M., and Akbar A.N. 1998. IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA$^+$ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J. Immunol.* **161:** 5909–5917.

Stitz J., Buchholz C., Engelstadter M., Uckert W., Bloemer U., Schmitt I., and Cichutek K. 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273:** 16–20.

Sutton R.E., Reitsma M.J., Uchida N., and Brown P.O. 1999. Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.* **73:** 3649–3660.

Szécsi J., Drury R., Josserand V., Grange M.P., Boson B., Hartl I., Schneider R., Buchholz C., Russell S.J., Cosset F.L., and Verhoeyen E. 2006. Targeted retroviral vectors displaying a cleavage site-engineered hemagglutinin (HA) through HA-protease interactions. *Mol. Ther.* (in press).

Takeuchi Y., Simpson G., Vile R., Weiss R., and Collins M. 1992. Retroviral pseudotypes produced by rescue of moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses. *Virology* **186:** 792–794.

Uckert W., Willimsky G., Pedersen F.S., Blankenstein T., and Pedersen L. 1998. RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2619–2627.

Valsesia-Wittmann S., Morling F.J., Hatziioannou T., Russell S.J., and Cosset F.-L. 1997. Receptor co-operation in retrovirus entry: Recruitment of an auxilliary entry mechanism after retargeted binding. *EMBO J.* **16:** 1214–1223.

Valsesia-Wittmann S., Morling F.J., Nilson B.H.K., Takeuchi Y., Russell S.J., and Cosset F.-L. 1996. Improvement of retroviral retargeting by using amino acid spacers between an additional binding domain and the N terminus of Moloney murine leukemia virus SU. *J. Virol.* **70:** 2059–2064.

Valsesia-Wittmann S., Drynda A., Deleage G., Aumailley M., Heard J.-M., Danos O., Verdier G., and Cosset F.-L. 1994. Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J. Virol.* **68:** 4609–4619.

Verhoeyen E., Dardalhon V., Ducrey-Rundquist O., Trono D., Taylor N., and Cosset F.-L. 2003. IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T-lymphocytes. *Blood* **101:** 2167–2174.

Verhoeyen E., Wiznerowicz M., Olivier D., Izac B., Trono D., Dubart-Kupperschmitt A., and Cosset F.L. 2005. Novel lentiviral vectors displaying "early acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells. *Blood* **106:** 3386–3395.

Vigna E. and Naldini L. 2000. Lentiviral vectors: Excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* **2:** 308–316.

Webb L.M., Foxwell B.M., and Feldmann M. 1999. Putative role for interleukin-7 in the maintenance of the recirculating naive CD4$^+$ T-cell pool. *Immunology* **98:** 400–405.

Wu B.W., Cannon P.M., Gordon E.M., Hall F.L., and Anderson W.F. 1998. Characterization of the proline-rich region of murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* **72:** 5383–5391.

Wu B.W., Lu J., Gallaher T.K., Anderson W.F., and Cannon P.M. 2000. Identification of regions in the Moloney murine leukemia virus SU protein that tolerate the insertion of an integrin-binding peptide. *Virology* **269:** 7–17.

# 第十三章　制备抗补体灭活的假型慢病毒载体

Ghiabe H. Guibinga 和 Theodore Friedmann

Department of Pediatrics, Center for Molecular Genetics, University of California, School of Medicine, San Diego, California 92093-0634

潘淑娟和张维　译



## 摘要

体内传送慢病毒或其他反转录病毒的主要障碍是它们在血清中不稳定。在体内，这些病毒粒子很快被非特异性补体介导的降解机制所降解。研究保护病毒质粒不被降解的方法有利于应用这种病毒载体更有效地进行体内基因的转递。本试验方案描述了几种产生补体稳定的慢病毒载体的方法，这些方法是通过利用含有补体调节蛋白 CD55（降解加速因子，DAF）的融合包装蛋白来产生假型病毒质粒，或是采用天然的 DAF 与包装蛋白共组装来产生新型的慢病毒。

## 引言

30 年前首次报道了人血清能降解反转录病毒（Welsh et al. 1975，1976；Cooper et al. 1976）。早期研究的反转录病毒主要在鼠和其他非人细胞系中包装，显示其对血清补体反应高度敏感。其实，病毒和其他细胞成分可以引发血清补体反应，引起血清介导的失活或病毒粒子降解（Takeuchi et al. 1994；Pensiero et al. 1996）。相反，起源于人细胞系包装的反转录病毒载体具有更好的抵抗灵长类血清补体失活的能力（DePolo et al. 1999）。

通过用不同的替代包被蛋白，如水泡性口炎病毒 G 蛋白（VSV-G）、杆状病毒 gp64 蛋白以及其他蛋白质来研发人、猫和马起源的假型慢病毒载体使产生高滴度和广趋性的病毒载体成为可能（Yee et al. 1994；Kumar et al. 2003）。然而在体外，不管用

哪种包装细胞系，用 VSV-G 和 gp64 产生的假型慢病毒载体都对血清补体失活敏感（DePolo et al. 2000；Schauber et al. 2004；Guibinga and Friedmann 2005）。而反转录病毒载体通过静脉注射到体内，在体内的稳定性与在体外血清中的稳定性相关（DePolo et al. 2000；Croyle et al. 2004）。这显示反转录病毒体内的稳定性同样受到免疫系统和补体反应的影响。该特征限制了这种载体应用于大的动物基因转染模型。相反，其他类型用不同包被蛋白（如猫内源病毒 RD114 蛋白）制作的假型病毒质粒可以高度抵抗血清补体介导的失活。而在用途方面，这种载体系统不如 VSV-G 假型质粒应用得广泛，这主要是由于它们较窄的趋向性和较低的滴度（Sandrin et al. 2002）。

哺乳动物补体系统可以保护宿主组织免受病原感染，但是有些情况下当这种系统针对自身组织会引起严重的损伤。存在哺乳动物系统中的一套补体调节蛋白（CRP）能帮助阻止自身互补介导的自身免疫缺陷。在人体中这些 CRP 已经被深入研究和了解，包括降解加速因子（DAF）CD55（Kirschfink 1997）。本章的试验方案是关于产生防止血清补体失活的假型反转录病毒载体。在这个方案中，编码补体调节蛋白 DAF 的转基因在病毒制备的过程中被加入。另外，假型慢病毒可以通过下述三种方法来产生，如用转基因编码的 DAF 融合蛋白和 VSV-G，或与 gp64 假型慢病毒载体，或简单在存在补体调节蛋白 DAF 的条件下进行病毒的制备（Guibinga and Friedmann 2005；Schauber-Plewa et al. 2005）。

## 方案 1

# 制备慢病毒载体

具有 VSV-G 或 gp64 假型的基于人的免疫缺陷病毒类型 1（HIV-1）的慢病毒载体可通过瞬时转染 3 个质粒产生。这些质粒包括一个包裹结构（pack）、一个转基因结构（trans）和一个包膜编码结构（env）。然而，制备补体稳定的慢病毒载体，还需要在标准的转染系统中加入第四个表达质粒。这个质粒编码转基因的 DAF 蛋白或融合蛋白 VSV-G-DAF（用于 VSV-G 假型载体）或 gp64-DAF（用于 gp64 假型载体）。瞬时三重或四重转染可通过任何非病毒转染试剂或磷酸钙沉淀方法来实现。

### 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

试剂

$CaCl_2$（2mol/L）<！>

Dulbecco's modified Eagle's 培养基（DMEM）包含 4.5g/L 葡萄糖（无血清完全）和 10%胎牛血清（FCS）

2×HBS（HEPES-buffered saline）

50mmol/L HEPES

280mmol/L NaCl

1.5mmol/L $Na_2HPO_4$<！>

用 5mol/L NaOH 调 pH 到 7.12。

HEK 293 T 细胞（ATCC，CRL 11268）

磷酸盐缓冲液 PBS

质粒

DAF 编码的转基因质粒

包膜编码质粒（env）

Gp64-DAF 融合蛋白编码的转基因质粒

包裹质粒（pack）

转基因质粒（trans）

VSV-G-DAF 融合蛋白编码转基因质粒

0.1×TE

10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）<!>

1mmol/L EDTA（pH 8.0）

双蒸水（$ddH_2O$）稀释 1∶10。

## 仪器

Beckman 转子，SW28 或相当

滤膜（0.45μm，500ml）

孵育，30℃或 37℃

SW 28 Ultra-Clear Beckman 管

组织培养板（10cm）

## 方法

### 质粒转染

1. 转染前一天，10cm 培养板 DMEM 培养基接种 293T 细胞 10%汇合。转染当天，细胞 40%～70%汇合。
2. 转染前 2h，更换新鲜的 DMEM 培养基。
3. 根据试验需要，按比例（表 1、表 2）混合 env、pack、tans 质粒和编码 DAF 或融和蛋白 gp64-DAF 或 VSV-G-DAF 质粒。

**表 1. 用于准备 VSV-G/DAF 修饰的假型源于 HIV-1 慢病毒载体不同质粒的浓度**

| | VSV-G/DAF | VSV-G/VSV-G-DAF |
|---|---|---|
| DNA 质粒比率(Pack∶Trans∶Env∶DAF) | 1∶1∶0.5∶0.1 | 1∶1∶0.5∶0.5 |
| DNA/10cm 培养板/μg | 10∶10∶5∶1 | 10∶10∶5∶5 |

**表 2. 用于准备 gp64/DAF 修饰的假型源于 HIV-1 慢病毒载体不同质粒的浓度**

| | gp64/DAF | gp64/VSV-G-DAF |
|---|---|---|
| DNA 质粒比率(Pack∶Trans∶Env∶DAF) | 1∶1∶1∶0.1 | 1∶1∶0.5∶0.5 |
| DNA/10cm 培养板/μg | 10∶10∶10∶1 | 10∶10∶5∶5 |

4. 加 125μl 2mol/L $CaCl_2$ 和 20μl 0.1×TE 到质粒混合物中，加 $ddH_2O$ 总体积到 1ml。
5. 逐滴加 1ml 的 DNA 混合物到 1ml 的 2×HBS 中，最大速度振荡，静置 30min。
6. 慢速逐滴加沉淀到细胞。
7. 孵育 16h。

    通过共展示 gp64-DAF 或 VSV-G-DAF 融和蛋白产生的 DAF 修饰的 gp64 或 VSV-G-假型源于 HIV-1 的慢病毒载体，孵育 30℃替代标准的 37℃。

8. 去掉培养基，用 10～12ml 新鲜的完全培养基替代。

### 病毒收集，过滤，浓缩

9. 转染后 48h，收集培养基，细胞板加入新鲜的 10～12ml 培养基。
10. 0.45μm 滤膜过滤收集的培养基。

    －80℃保存过液。

11. 每天重复步骤 8～9（第一次收集 VSV-G 假型病毒后 2～3d，收集 gp64 假型病毒后 4～6d）。

    因为 VSV-G 细胞毒性，很少产生 VSV-G 假型质粒细胞存活超过 4d，相比 gp64 低毒性可以在转染 gp64 后一周细胞存活收集培养基。

12. 汇合收集的培养基。Ultra-clear 管（最大 30ml/管）SW28 转子，4℃，25 000r/min 离心 2h。
13. 去处上层液体，完全 DMEM 培养基重悬沉淀。－80℃保存重悬质粒，供进一步分析使用。

## 方案 2

## 体外血清失活分析

在人的正常血清补体中滴定评价构建病毒载体的补体稳定性。病毒滴定量采用标准的终点稀释法。检测构建假型载体的血清补体稳定性，推荐使用人血清补体 $CH_{50}$ 100 或以上。测定 $CH_{50}$ 通过给定的血清样品溶解 50%标准悬浮的羊红血球。$CH_{50}$ 0～100 的样品被认为是低补体水平的，而 $CH_{50}$ 大于 100 的为可用的。具有高补体活性的样品是最好的（>300）。

基于前期试验研究，DAF 包膜的假型慢病毒载体在滴定正常人血清补体中没有明显减少。相反，天然 gp64 或 VSV-G 包膜假型载体在正常血清补体孵育时，对比在 DMEM 或热失活的血清中，传染率降低 10%。

在人血清补体反应中，体外提高假型慢病毒载体稳定性，可以部分的导致在体内稳定性的提高（还未证实其中的关联）。然而，补体失活敏感性并不是唯一决定质粒体内稳定性和传送的药代动力学条件的因素。其他因素，如血清蛋白的调理作用，以及与质粒的相互作用，也会在慢病毒质粒体内稳定性和基因传送中起作用。

### 材料

#### 试剂

细胞，指数生长的 293 或 HT1080（人纤维肉瘤）

DMEM 培养基（完全的和无血清的）包含 10%胎牛血清

人血清补体（$CH_{50}$>100；正常的和热失活的）

失活补体，56℃孵育 1h。

Polybrene（聚凝胺）

假型 HIV-1 源的慢病毒载体（>$10^7$转染单位/ml）

应该构建编码绿色荧光蛋白的质粒。

### 仪器

水浴锅（37℃和 56℃）

振荡混合器

## 方法

1. 用等量的人正常血清补体稀释 100μl 载体。用热失活人血清或完全 DMEM 培养基作为对照。
2. 孵育载体补体混合物 37℃、1h。每 15min 振荡 2s。
3. 孵育之后用无血清 DMEM 稀释反应液 10 倍。
4. 在存在 8μg/ml 的 Polybrene 的条件下，系列稀释含有编码 GFP 的病毒载体，感染 HT1080 或 293 细胞。
5. 转导后 48h，在含有最高稀释病毒载体的培养板上进行 GFP 阳性计数。
6. 计算病毒滴定量（阳性表达作为 GFP 转导单位/ml；GFP-TU/ml）：

   病毒滴定量=（GFP 聚焦数×稀释因子）/用于转导的载体的体积

## 参考文献


Cooper N.R., Jensen F.C., Welsh R.M., Jr., and Oldstone M.B. 1976. Lysis of RNA tumor viruses by human serum: Direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway. *J. Exp. Med.* **144:** 970–984.

Croyle M.A., Callahan S.M., Auricchio A., Schumer G., Linse K.D., Wilson J.M., Brunner L.J., and Kobinger G.P. 2004. PEGylation of a vesicular stomatitis virus G pseudotyped lentivirus vector prevents inactivation in serum. *J. Virol.* **78:** 912–921.

DePolo N.J., Reed J.D., Sheridan P.L., Townsend K., Sauter S.L., Jolly D.J., and Dubensky T.W., Jr. 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* **2:** 218–222.

DePolo N.J., Harkleroad C.E., Bodner M., Watt A.T., Anderson C.G., Greengard J.S., Murthy K.K., Dubensky T.W., Jr., and Jolly D.J. 1999. The resistance of retroviral vectors produced from human cells to serum inactivation in vivo and in vitro is primate species dependent. *J. Virol.* **73:** 6708–6714.

Guibinga G.H. and Friedmann T. 2005. Baculovirus GP64-pseudotyped HIV-based lentivirus vectors are stabilized against complement inactivation by codisplay of decay accelerating factor (DAF) or of a GP64-DAF fusion protein. *Mol. Ther.* **11:** 645–651.

Kirschfink M. 1997. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* **38:** 51–62.

Kumar M., Bradow B.P., and Zimmerberg J. 2003. Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64. *Hum. Gene Ther.* **14:** 67–77.

Pensiero M.N., Wysocki C.A., Nader K., and Kikuchi G.E. 1996. Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum. *Hum. Gene Ther.* **7:** 1095-1101.

Sandrin V., Boson B., Salmon P., Gay W., Negre D., Le Grand R., Trono D., and Cosset F.L. 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100:** 823–832.

Schauber C.A., Tuerk M.J., Pacheco C.D., Escarpe P.A., and Veres G. 2004. Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro. *Gene Ther.* **11:** 266–275.

Schauber-Plewa C., Simmons A., Tuerk M.J., Pacheco C.D., and Veres G. 2005. Complement regulatory proteins are incorporated into lentiviral vectors and protect particles against complement inactivation. *Gene Ther.* **12:** 238–245.

Takeuchi Y., Cosset F.-L.C., Lachmann P.J., Okada H., Weiss R.A., and Collins M.K.L. 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J. Virol.* **68:** 8001–8007.

Welsh R.M., Jr., Cooper N.R., Jensen F.C., and Oldstone M.B. 1975. Human serum lyses RNA tumour viruses. *Nature* **257:** 612–614.

Welsh R.M., Jr., Jensen F.C., Cooper N.R., and Oldstone M.B. 1976. Inactivation of lysis of oncornaviruses by human serum. *Virology* **74:** 432–440.

Yee J.-K., Friedmann T., and Burns J.C. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43:** 99–112.

# 第十四章　构建由 2A 多肽连接的多顺反子载体

Andrea L. Szymczak-Workman，Kate M. Vignali 和 Dario A. A. Vignali
Department of Immunology，St. Jude Children's Research Hospital，Memphis，Tennessee 38105
潘淑娟　译



## 摘要

需要稳定的多顺反子载体用于多基因传送是现代生物医药技术的前沿。这一章介绍通过使用 2A 多肽连接的多顺反子载体从单一可读框来表达多重蛋白质的方法。当这些小的序列被克隆到基因间区时，它们允许通过在 2A 多肽序列中的一个新颖的切割方式从单一的载体上高效地产生不相连的蛋白质产物。

用传统的方法表达两个以上的基因有几个限制，最显著的是不平衡的蛋白质表达和大的蛋白质产物。使用 2A 多肽序列可以减少这种影响。它们是小的（18～22 个氨基酸）有不同氨基酸末端的序列，可以降低同源重组，也可以在同一载体中使用多个不同的 2A 多肽序列。重要的是 2A 隔开的不同基因可以将近 100%的协同表达。并且与基因在载体中的位置次序关系不大。

具有 2A 多肽插入的多顺反子表达载体可以有很多不同的应用，包括生物医药研究、基因治疗、植物生物化学。这种技术的潜在应用几乎是无限的。例如，表达多重药物抗性基因在癌症治疗中可以保护造血干细胞，或表达多种自杀因子、抗血管因子和（或）免疫活性蛋白质用于增强抗肿瘤的治疗。

## 引言

在过去几年中，研究者寻找新的方法来表达多重基因（de Felipe 2002）。目前，最

令人兴奋的方法得益于单链 RNA 病毒介导的多重基因表达策略。细小的核糖核酸病毒利用 2A 多肽作为水解酶顺式作用元件（CHYSEL），介导两个蛋白质之间的“切割”（de Felipe 2004）。这个序列最早在口脚病病毒（FMDV）（Ryan and Drew 1994）中发现，它编码一个单独长的可读框，2A 序列分开两个基因产物。在两个基因产物中，2A 高度保守的 C 端甘氨酸残基和 2B 序列的脯氨酸残基之间的 2A 序列羧基端上发生一种新颖的切割（Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-↓-Pro）（图 1）。2A 多肽序列在不影响 2B 翻译的情况下通过“核糖体跳读”机制削弱形成正常的多肽键（Donnelly et al. 2001b）。自从这些被发现以来，许多类似 2A 的序列在其他病毒和一些寄生载体中发现，包括昆虫病毒、轮状病毒和锥体虫（更多细节见 http://www.st-anddrews.ac.uk/ryanlab/Index.htm；Szymczak and Vignali 2005）。最复杂的基于 2A 的多顺反子载体通过使用 3 个不同的 2A 多肽序列编码 T 细胞受体（TCR）复合物的 4 个 CD3 链（Szymczak et al. 2004b）。这个载体可以恢复 CD3 缺陷鼠的 T 细胞发育，显示 4 个 CD3 链可以有效地切割和表达。

| 家族 | 例子 | 缩写 | 序列 |
| --- | --- | --- | --- |
| | | | 2A“切割”位点 ↓ |
| picornaviridae | FMDV | F2A | VKQTLNFDLLKLA**GDVESNPG** **P** |
| | ERAV | E2A | QCTNYALLKLA**GDVESNPG** **P** |
| | PTV1 | P2A | ATNFSLLKQA**GDVEENPG** **P** |
| Tetraviridae | TaV | T2A | EGRGSLLTC**GDVEENPG** **P** |

图 1. 2A 多肽序列成功在体内应用。这些序列成功地在体内和体外被检测（Szymczak and Vignali 2005）。口脚病病毒（FMDV）；马鼻炎 A 病毒（ERAV）；猪微小核糖核酸病毒 1（PTV1）；TaV 病毒（Tav）；切割位点的保守残基用粗体显示。想全面了解发表的 2A 序列，参见 http：//www. st-andrews. ac. uk/ryanlab/index. htm.

## 载体设计和构建

### 蛋白质功能和亚细胞定位

使用 2A 多肽序列可以与蛋白质的亚细胞定位协同一致，包括细胞表面、细胞质和腔的隔室、细胞核、线粒体（de Felipe and Ryan 2004；Lrens et al. 2004；Szymczak et al. 2004b）。然而一个重要的考虑是靶向内腔的蛋白质（如具有一段信号序列但并不具有跨膜区域的蛋白区）。在哺乳动物细胞而不在酵母中，腔内定位的蛋白质会发生“滑动”现象（de Felipe and Ryan 2004）。例如，如果在分泌蛋白之后连接绿色荧光蛋白，这种蛋白质正常是定位在细胞质，核糖体仍然连接在易位子上，此时 GFP 却会转位到内腔。这对于蛋白质的细胞质、细胞核或线粒体定位是一个明显的问题。因此，如果需要混合不同靶定位蛋白，并且包括其中一个蛋白质定位在内腔，那么就应该考虑不同蛋白质在 2A 连接载体中的顺序了（如将分泌或内腔蛋白置于其他蛋白质的后面）。

### A 2A 标签连接在上游蛋白

切割发生在 2A 多肽序列末端，因此大部分多肽连接在上游蛋白质的 C 端。目前，没有报道连接这种多肽序列的副作用。一些蛋白质会受额外多肽影响的需要考虑（例

如，它们的功能会受其他额外标签的影响，如 FLAG、Myc、6×His 等）。对于分泌蛋白，在蛋白质和 2A 肽之间插入 furin 切割位点显示可以切除掉这个“标签”（Fang et al. 2005）。发展其他的蛋白质水解方法切除多肽序列很有希望。需要强调的是这个残基标签有两个优点：第一，这种 2A 多肽的存在增加了蛋白质分子质量，在要区分突变或内源蛋白质共表达时是很有用的（图 2A，B）（Szymczak et al. 2004b）。第二，针对 2A 肽的抗体在 Western 杂交和免疫组化中非常有效（图 2C）（deFelipe et al. 2006；Holst et al. 2006）。因此 2A 肽是蛋白质鉴定很有用的工具。最后，需要指出的是 2A 所有蛋白质会有一个氨基末端的脯氨酸（P）（图 3）。目前我们和其他研究者没有发现这个附加氨基酸的有害效果（de Felipe 2002；Szymczak and Vignali 2005）。有信号肽的蛋白质序列会有效加工和去除这个脯氨酸。如 N 端规则预测的，这种细胞质产生的蛋白质是稳定的（Varshavsky 1992）。

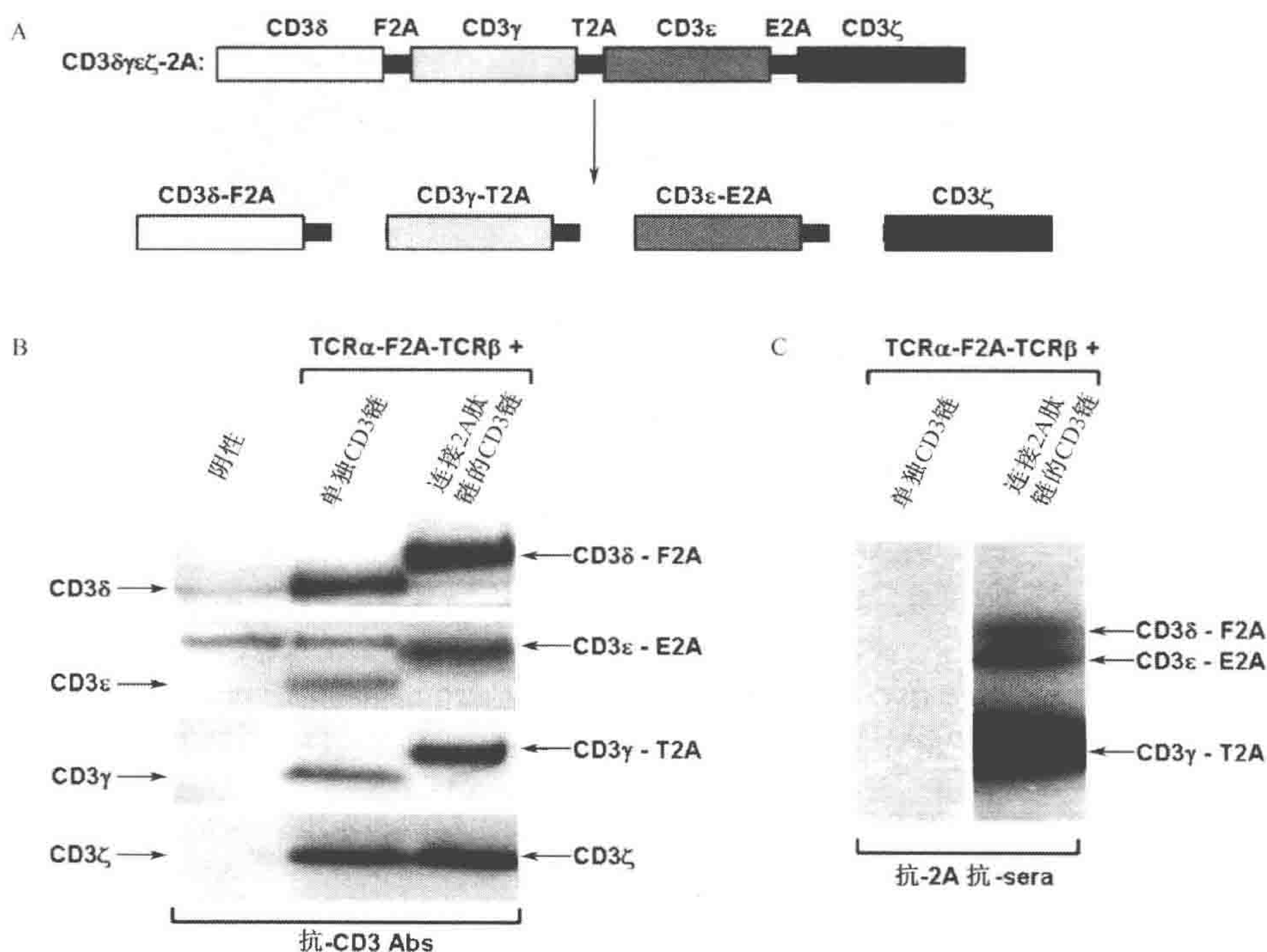



图 2. 生物化学方法分析 2A 多肽介导的切割。3T3 细胞单独的 CD3 链（CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ）转染或 2A 连接的 CD3 链伴随 2A 连接的 TCRα。A. 2A 多肽连接子构建示意图。B. 细胞裂解抗 TCR 抗体免疫沉淀，SDS-PAGE 分离。通过抗单独 CD3 链的抗体杂交膜。连接有 2A 肽链的 CD3 链电泳发生迁移（CD3ζ）。C. 细胞裂解，SDS-PAGE 分离蛋白质。通过抗 2A 肽抗血清杂交膜（GDVEENPG）。F2A 和 E2A 连接的条带减弱，因为这些序列包括一个丝氨酸取代第二位的谷氨酸（GDVESNPG）。（J. Holst and D. Vignali 未发表）。

### 在真核组织中表达

目前为止，2A 多肽系统在所有检测过的真核系统中稳定，包括哺乳动物细胞、酵母、植物，以及小麦细菌溶解产物体外转录/翻译系统。以 2A 多肽链为基础的切割需

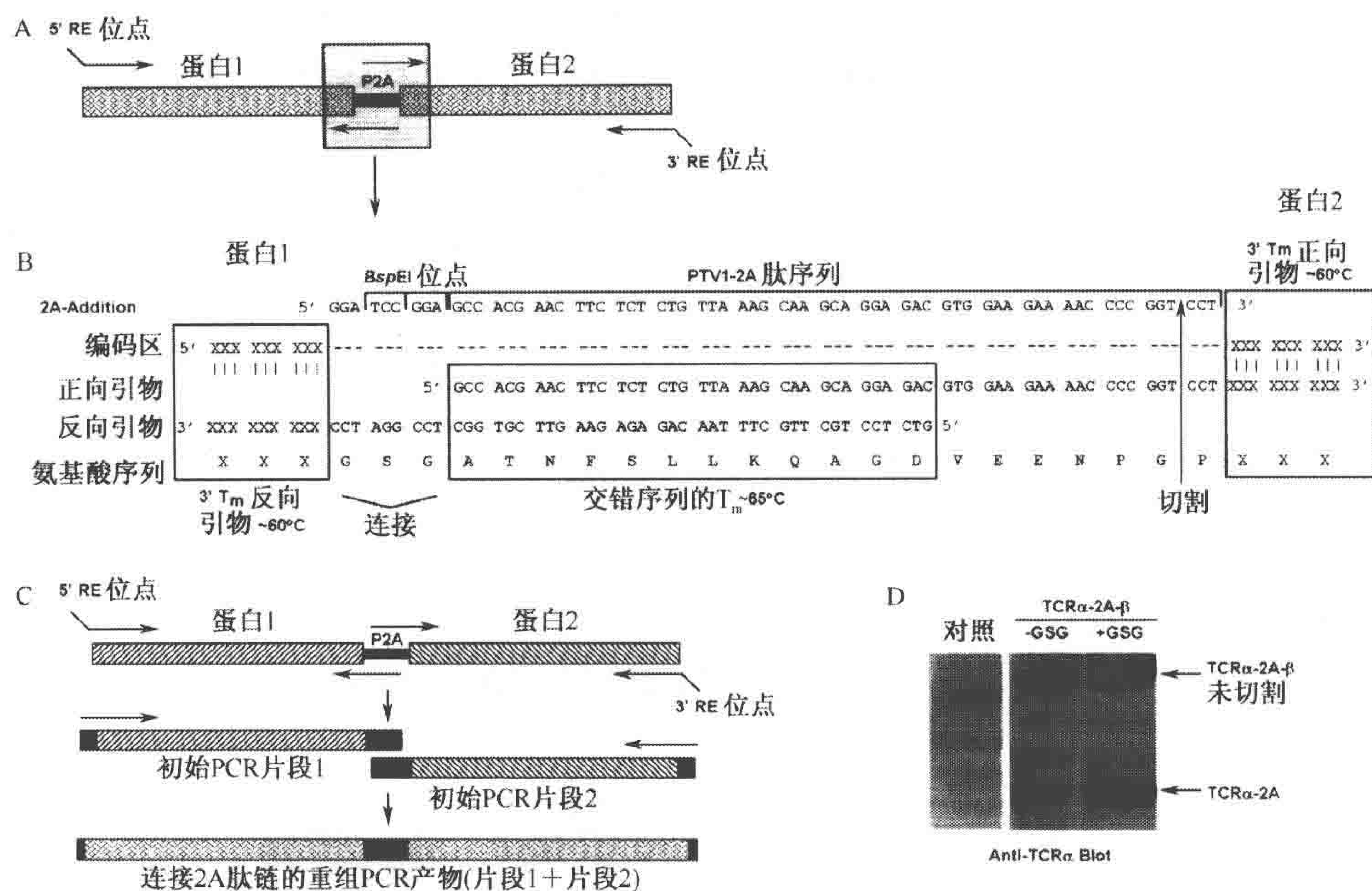



图 3．添加 2A 多肽到蛋白质的引物设计策略。A．图示两个蛋白质通过 PVT1 2A 多肽连接。标注出 5′和 3′克隆到载体中的引物的限制酶酶切位点。在蛋白 1 和 2A 多肽之间的 GSG 连接子内部插入 *Bsp*EI 位点。B 图显示阴影部分。B. A 图显示了用于 2A 多肽连接的两个顺反子的引物。在正向和反向引物的 3′端都被框了起来。假定的蛋白质氨基酸和碱基对用“X”代替。根据 3′ $T_m$ 范围为 60～65℃，靶顺反子的碱基对数量可以增加。两个初始片段交错序列的理想 $T_m$ 为 65℃左右。GSG 连接子中插入的 *Bsp*EI 位点也在蛋白 1 和 P2A 间显示。C. 图示克隆策略，使用 B 中引物，初始和重组两步 PCR 产生所需片段。D. 293T 细胞转染 CD3 链连接 2A 多肽链连接的 TCRα、TCRβ、包括或者不包括 GSG 连接子、空载体对照。细胞裂解，蛋白质 SDS-PAGE 电泳，抗 TCRα 抗体杂交。通过对比细胞 TCRαβ-GSG 蛋白质比没有 GSG 连接子的 TCRαβ 未切割产物减少，说明 GSG 可以提高 2A 多肽的切割效率。

要由 80S 核糖体翻译，因此，这种系统会在任何真核生物中起作用。而 70S 核糖体翻译的多肽不能切割，所以在原核生物中这种系统不能正常加工。

**2A 多肽序列核基因顺序**

文献广泛地研究了来源于 FMDV 的 2A 序列。其他序列，包括来源豌豆黄顶病毒 1（PTV-1）、马鼻炎 A 病毒（ERAV）和四面体病毒（TAV）（Szymczak and Vignali 2005）的也可以成功地应用。尽管这些序列都可以很好使用，但我们的优先顺序是 P2A、T2A、F2A、E2A（图 1）。其他 2A 序列见 http://www.st-andrew.ac.uk/ryanlab/2Alike.pdf。为了降低同源重组风险，在一个反转录病毒载体上表达两个以上基因需要使用不同的 2A 多肽链。另外，2A 序列的密码子多态性可以构建不同核苷酸序列编码相同多肽序列。在 2A 多肽 C 端的编码切割基序的序列必须是相同的（图 1）。最后，必须考虑载体表达基因的顺序，当心滑流和 2A 标签应保留在除最后一个蛋白质的所有其他蛋白质上的问题。

**加入 GSG 连接子**

2A 多肽的切割效率受上游多肽和蛋白质的影响（Donnelly et al. 2001a; Szymczak et al. 2004a)。我们的研究表明，在上游顺反子和 2A 多肽间插入 Gly-Ser-Gly（GSG）连接子可以使这种不确定性失效（图 3)。我们在所有的载体蛋白重组中得到 100%的切割。因此推断，这个连接子提供更多的灵活性和通过释放不适宜的构象来增强切割。

**引物设计**

好的可读框包括单一的可读框由一个带有 Kozak 序列（Kozak 1987）的起始密码和一个终止密码。我们的 5′引物包括：6bp GC 富含夹子［阻止“呼吸”作用促进限制酶（RE）切割］-RE 位点-带有 ATG Kozak 序列（如 GxxAxxATGG）-退火序列［如 CGCTCTGAATTCGCCAGCATG.......（下画线为 *Eco*RI 位点)］。我们的 3′引物如下：退火序列-RE 位点-6bp GC 富含夹子［例如，........TGACTCGAGTGTCGG（下画线为 *Xho*I 位点)］。在 3′和 5′引物内设计可以插入 2A 顺反子可读框的多克隆位点可以有利于做克隆。如果需要所有蛋白质的甲硫氨酸起始密码子可以保留，但是除了最后一个蛋白质其他蛋白质终止密码子应该去除。2A 顺反子可读框可以在 2A 多肽序列前加入单一的酶切位点。这样，可以产生简单的“穿梭”突变体。

**优化退火序列的溶解温度**

我们试验表面如果复性温度高，PCR 产物很少有突变。因此，设计引物的溶解温度（$T_m$）必须适当。以我们的经验，同源靶序列的 3′引物 $T_m$ 为 60～65℃（图 3)。因此，复性序列的长度是由达到目的 $T_m$ 所需要的碱基数决定的。进一步，我们尽可能让 3′为 C 或 G，以便降低引物模板的“呼吸”。我们使用交错引物编码 2A 序列而不是使用正向反向引物完全重叠，这样的引物能成功地减少突变产生（图 3)。在这个例子中，我们调整了重叠长度，使 $T_m$ 大约 65℃。这种策略导致引物长度在 80bp 左右，但是我们经常使用超过 120bp 的引物扩增而没有出现异常。

## 方案 1

# 通过重组 PCR 产生 2A 连接的多顺反子可读框

这个方案描述使用重组 PCR 连接多重 2A 连接的蛋白质序列。最终构建的序列亚克隆到表达载体上。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

适合纯化 DNA 的琼脂糖凝胶

煮沸 2～3min 在 1×TAE 中溶解高纯度的琼脂糖。55℃水浴直到温度平衡。加 3～5μl EB。胶凝后，1×TAE 充满容器，去掉梳子。超过 500bp 片段的使用 1%琼脂糖胶。较小产物，琼脂糖浓度提高到 2%。

克隆载体

有很多不同类型商业化载体编码不同选择可读框、抗生素抗性基因、荧光蛋白。重要的是确定所有载体系统检测不到2A多肽介导的“切割”，然后考虑克隆策略。

DNA聚合酶和缓冲液

产物长度，模板中GC比例，引物 $T_m$ 影响酶的选择。我们一般使用Advantage-HF 2 PCR试剂盒（Clontech），可以一致的产生3kb产物低的突变率。其他高忠实性酶（Advantage-GC，Clontech；Phusion High-Fidelity DNA聚合酶，Finnzymes；扩增长的模板，Roche Applied Science），这些试剂都成功地在我们实验室使用，选择依赖于使用的模板和引物长度，根据操作手册使用。

DNA大小标志

dNTP

准备10mmol/L dNTP、无菌水溶解、PCR级别去离子水。分装保存－80℃长期（＞2月）－20℃（＜2月）

EB（10mg/ml）＜!＞

加1g EB到100ml去离子水中，搅拌数小时直到完全溶解。室温保存到不透光瓶子中。

10×琼脂糖胶上样缓冲液（例如，0.25％溴酚蓝、0.25％二甲苯菁FF、水溶解50％甘油）

$H_2O$ PCR级别

PCR引物寡核苷酸

PCR级别无菌水准备工作浓度20μmol/L，分装保存－20℃

模板DNA

酶PCR用100ng质粒DNA或cDNA。

50×TAE（Tris/Acetate/EDTA）缓冲液

溶解242g Tris＜!＞用57.1ml冰乙酸＜!＞，100ml 0.5mol/L EDTA（186.1g EDTA·$2H_2O$二钠，加水到1L，调pH到8.0），用去离子水稀释到1×TAE使用。

## 仪器

用于核酸分离的水平胶电泳仪，包括电源和适当的分离梳

用3～5mm宽齿的梳子上样消化液。大的上样量用于胶回收。所以推荐用7～10mm宽齿梳子。

PCR纯化或胶回收试剂盒

PCR仪

薄壁PCR管

紫外灯

## 方法

1. 为产生初始PCR产物，准备如下反应：

| | |
|---|---|
| 模板DNA（100ng） | 1.0μl |
| 聚合酶缓冲液 | 5.0μl |

正向引物（5′）（20μmol/L 储存液） 1.25μl
反向引物（3′）（20μmol/L 储存液） 1.25μl
dNTP（10mmol/L 储存液） 2.0μl
DNA 聚合酶（Advantage-HF 2） 1.0μl
加 PCR 级去离子水到终体积 50μl。

Advantage-HF2 系统提供两种缓冲液：一种 Advantage-2 缓冲液和一种高保真缓冲液。后者可以用于绝大多数反应系统，但是较长的片段和较困难反应的模板需要按说明书处理，或加 5%DMSO< !>，或 1mol/L 甜菜碱（Rees et al. 1993；Varadaraj and Skinner 1994；Baskaran et al. 1996；Henke et al. 1997）。

2. 按以下条件进行 PCR 反应：

| 循环次数 | 变性 | 复性 | 延伸 |
|---|---|---|---|
| 1 | 94℃，1min | | |
| 2 | 94℃，10～30s | 58℃，1min | 72℃，2～4min |
| 33 | 94℃，10～30s | 68℃，30s | 72℃，2～4min |
| 1 | | | 72℃，5～10min |

保持在 4～8℃中

使用两步反应协议。第一步，3′同源靶顺反子复性。两轮反应之后，全部的引物会结合到模板上，引物有效的 $T_m$ 会明显提高。第二步，复性温度提高到 68℃，可以降低错配发生概率。第二阶段同样可以使用两步反应。第一阶段的复性温度取决于 PCR 引物的 $T_m$。我们设计的 3′引物 $T_m$ 为 60～65℃。在前两轮的 PCR 反应中，起始复性温度大约低于 3′引物 $T_m$ 3℃，可以使引物和变性模板复性。在第二阶段应该尽可能缩短变性时间，引物单链 DNA 在高温下会引起脱嘌呤，以及酶活性的损失。延伸反应的时间取决于 PCR 产物的大小。如上述所列的反应条件和试剂，每 kb 产物反应时间 1min。最佳循环数取决于起始模板浓度。为降低非特异性背景产物，选择可产生足够量反应产物的最低循环数。如果没有所要的产物，可能需要改变复性温度。加入 DMSO 和甜菜碱可以增加产量和 PCR 特异性，特别是高 GC 模板。其他试剂和参数可以同样有效，但是需要优化。

3. 检验初始 PCR 产物分子质量，上样 5μl 到琼脂糖凝胶纯化。

混合 5μl 反应液与适量的 10×上样液和水到适当体积上样，加上 DNA ladder 对照。电泳跑胶（通常 80～90V）直到上样染料迁移到足够距离，可以分离 DNA 片段。胶在 UV 灯下显影。

4. 使用 PCR clean-up 试剂盒或者胶提取试剂盒纯化初始 PCR 产物，去除多余探针。

如果有背景条带使用胶回收方法。许多 PCR clean-up 试剂盒不能有效去除长的 PCR 引物（>70bp）或者导致小片段损失（<500bp）。

5. 定量 PCR 初始产物量，2～5μl 琼脂糖凝胶电泳带有 DNA ladder 检验纯度。

用于重组 PCR，很重要的是使用等当量的初始 PCR 产物作为模板，例如，每个 PCR 产物的绝对数量应该相等。在决定使用多少产物时要考虑到产物分子质量的差异。使用 100ng 最大分子质量的初始 PCR 产物，以下公式计算等当量的小分子质量的初始产物使用量：
（100）（小分子质量的初始产物 bp）/（最大分子质量的初始产物 bp）＝（每 100ng 最大分子质量初始产物应该使用的小分子质量的初始产物 ng 质量）。

6. 装配重组 PCR 条件如步骤 1 所述，初始 PCR 产物为模板和延伸引物，如包含起始

和终止密码子序列而不是包括 2A 的序列（图 3）。

对于重组 PCR 改变复性温度不是必需的。延伸时间相应的延长引物产物的质量增大。重组 PCR 可以使用超过两个 PCR 产物，条件是片段之间的重叠序列不同，每个片段摩尔量相同。如果试验产生重组产物比较困难，分几个阶段重组 PCR 反应，每个阶段使用 2～3 个初始模板，直到产生全长的产物。要知道，增加 PCR 循环数会提高出错概率。

7. 如步骤 3 检测产物分子质量，如步骤 4 纯化产物。
8. 限制酶酶切延伸引物中酶切位点，克隆终产物到表达载体中。
9. 使用感兴趣的表达基因或载体特异性引物测序。

重要的是要确保 2A 多肽序列正确，因为任何氨基酸组成改变会影响切割效率。

## 方案 2

## 检测 2A 多肽切割

最容易和有效地检测 2A 多肽切割的方法是瞬时转染 293T 细胞（人胚肾细胞），然后如下所述用 Western 杂交检测。293T 细胞容易培养，易于转染不同载体。切割可以使用抗体检测靶蛋白质或者抗 2A 血清（现在还没有商品化产品）。其他选择方法依赖于要检测的蛋白质或载体系统。我们也有效地使用非细胞体外转录翻译系统检测 2A 切割（Szymczak et al. 2004b）。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

抗蛋白质或 2A 抗体

DMEM 培养基

完全培养基和无血清培养基。完全培养基添加了 10%胎牛血清、2mmol/L L-谷氨酸、1mmol/L 丙酮酸钠、100μmol/L MEM 非必需氨基酸、5mmol/L HEPES、$5.5\times10^{-5}$ 单位的β-巯基乙醇<!>、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素<!>。另外，20μg/ml 环丙沙星可以阻止支原体污染。所有试剂和培养基都有商业产品。

裂解液（如诺乃洗涤剂-P40 或 RIPA 裂解缓冲液，参见 Harlow and Lane 1999）

磷酸盐缓冲液（PBS）

质粒 DNA

转染试剂

许多转染试剂可用，但是我们发现转染 293T 细胞使用 TransIT-LT1、TransIT-293T（Mirus、Madison、Wisconsin）或者 FuGENE 6 转染试剂（Roche）。如果没有这些试剂，使用磷酸钙转染同样可以。

胰酶/乙二胺四乙酸<!>

293T 是贴壁细胞；使用胰酶 EDTA 可以促使细胞脱离培养板减少细胞成团。

指数生长 293T 细胞

仪器

SDS-PAGE Western 杂交仪

标准组织培养仪，包括 100mm 板

这个方案设计针对 293T 细胞 100mm 组织培养板培养。如果使用不同大小培养板培养细胞，适量调整细胞密度和试剂用量。

## 方法

1. 转染前 24h 胰酶消化收集细胞。
   a. 去除贴壁细胞培养基（DMEM），PBS 冲洗去除痕量培养基，加 3～4ml 胰酶 EDTA。
   b. 室温孵育 2～3min，直到细胞从培养板脱落。轻轻重悬细胞转移到圆锥管中，10ml 完全培养基洗板，转移冲洗培养基到管中，中和胰酶。
   c. 1000r/min 离心 10min。去除上清，5ml 培养基重悬沉淀，细胞计数。接种细胞到 100mm 组织培养板浓度 $2\times10^6$ 个细胞/板，加 10ml 培养基。37℃过夜使细胞贴壁。
2. 根据操作说明，选择试剂转染细胞。使用 10μg 载体/板，37℃孵育细胞 48h 以上。
3. 如步骤 1 一样，胰酶消化收集细胞。
4. 检测切割，溶解细胞，SDS-PAGE 电泳分离蛋白质，Western 杂交。封阻和探针选择适合靶蛋白质的标准程序。如果有研究蛋白质的抗体 Western 杂交有效，可以用来检测切割的效率。2A 多肽的抗体没有商品化产品，但是可以自己制备。根据蛋白质分子质量，它们可以鉴定感兴趣蛋白质从切割和非切割材料中区分开。

   转染有多重顺反子载体细胞表达的蛋白质可以与编码单独蛋白质粒转染细胞对比。要知道，2A 标签会引起蛋白质分子质量的微小变化。

## 参考文献


Baskaran N., Kandpal R.P., Bhargava A.K., Glynn M.W., Bale A., and Weissman S.M. 1996. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* **6:** 633–638.

de Felipe F.P. 2002. Polycistronic viral vectors. *Curr. Gene Ther.* **2:** 355–378.

———. 2004. Skipping the co-expression problem: The new 2A "CHYSEL" technology. *Genet. Vaccines Ther.* **2:** 13.

de Felipe F.P. and Ryan M.D. 2004. Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic* **5:** 616–626.

de Felipe P., Luke G.A., Hughes L.E., Gani D., Halpin C., and Ryan M.D. 2006. *E unum pluribus*: Multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol.* **24:** 68–75.

Donnelly M.L., Hughes L.E., Luke G., Mendoza H., ten Dam E., Gani D., and Ryan M.D. 2001a. The "cleavage" activities of foot-and-mouth disease virus 2A site- directed mutants and naturally occurring "2A-like" sequences. *J. Gen. Virol.* **82:** 1027–1041.

Donnelly M.L., Luke G., Mehrotra A., Li X., Hughes L.E., Gani D., and Ryan M.D. 2001b. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein "cleavage" mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal "skip". *J. Gen. Virol.* **82:** 1013–1025.

Fang J., Qian J.J., Yi S., Harding T.C., Tu G.H., VanRoey M., and Jooss K. 2005. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.* **23:** 584–590.

Harlow E. and Lane D. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., and Loening S.A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **25:** 3957–3958.

Holst J., Vignali K.M., Burton A.R., and Vignali D.A. 2006. Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T-cell receptor retrogenic mice. *Nat. Methods* **3:** 191–197.

Kozak M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196:** 947–950.

Lorens J.B., Pearsall D.M., Swift S.E., Peelle B., Armstrong R., Demo S.D., Ferrick D.A., Hitoshi Y., Payan D.G., and Anderson D. 2004. Stable, stoichiometric delivery of diverse protein functions. *J. Biochem. Biophys. Methods* **58:** 101–110.

Rees W.A., Yager T.D., Korte J., and von Hippel P.H. 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **32:** 137–144.

Ryan M.D. and Drew J. 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* **13:** 928–933.

Szymczak A.L. and Vignali D.A. 2005. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5:** 627–638.

Szymczak A.L., Workman C.J., Wang Y., Vignali K.M., Dilioglou S., Vanin E.F., and Vignali D.A. 2004a. Addendum: Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single "self-cleaving" 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* **22:** 1590.

———. 2004b. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single "self-cleaving" 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* **22:** 589–594.

Varadaraj K. and Skinner D.M. 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* **140:** 1–5.

Varshavsky A. 1992. The N-end rule. *Cell* **69:** 725–735.

## 网络资源

http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/Index.htm Picornavirus Group Homepage, Ryan Lab, University of St. Andrews.

http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/2A_2Alike.pdf Peptide Sequences, Ryan Lab, University of St. Andrews.

# 第十五章　第一代腺病毒载体的构建

P. Joel Ross 和 Robin J. Parks

[*] Molecular Medicine Program, Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada;
[†] Department of Biochemistry, Microbiology, and Immunology, Centre for Neuromuscular Disease, and [‡] Department of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

潘淑娟和葛郁芝　译



## 摘要

在基础科学研究和基因治疗研究中，用遗传加工过的腺病毒（Ad）传输外源基因到哺乳动物细胞是非常引人注目的方法。产生腺病毒载体的过程包括：①通过细菌体内重组，克隆转基因到可传染性质粒；②在补给细胞中营救和扩增载体；③纯化载体。所有这些步骤可以通过使用商品化的试剂、质粒、细胞系来完成。第一代 Ad 有较大的克隆容量（5～14kb）可有效地转染静止细胞和增殖细胞。可以扩增产生高滴度的储存液（在 3L 培养基中有 $10^{11}$～$10^{13}$ 个载体质粒）。另外，Ad 很少整合到宿主的基因组中，因此相对安全。然而，Ad 载体生产通常需要 4～6 周，可能会在体内产生混杂的寄主细胞转染。此外，针对病毒载体骨架编码的蛋白质的免疫反应可能发生，这就限制了体内表达转基因载体的应用。尽管如此，Ad 仍然是最有效和最通用的基因传递系统。这里我们讨论当前的用于构建、扩增、纯化和鉴定第一代 Ad 载体的方法。

## 引言

遗传学加工过的 Ad 在医药应用和基础科学研究方面，作为传送外源 DNA 到哺乳动物细胞工具，非常有吸引力。对非专业研究人员来说，生产 Ad 载体是相对容易的，因为当前生产 Ad 载体的方法只需要掌握基本的分子生物学和细胞培养技能就行。这些载体有相对大的克隆容量，容易扩增和纯化到较高的滴度。另外 Ad 载体不

能整合，但是它们能够长期表达蛋白质。尽管 Ad 载体可以以一种不依赖细胞周期的方式转导多种哺乳动物细胞类型，这就使得体内传递基因到特异的组织变得困难重重。

大部分 Ad 载体是基于了解比较透彻的人的 Ad 血清型 2 或 Ad 血清型 5 的。36kb 线形双链 DNA 基因组编码的基因可根据它们表达的时间进行分类（图 1），在 DNA 复制之前，早期表达的基因是 E1、E2、E3 和 E4。早期基因编码蛋白质的功能是激活其他 Ad 基因、复制病毒 DNA、干扰免疫识别被感染细胞和修饰寄主细胞的环境，使之更有利于病毒的复制。晚期基因（主要是晚期转录单位，如 pIX 和 Iva2）在基因复制之后表达，主要编码蛋白质参与衣壳的产生和包装 Ad 基因组。病毒 DNA 同样也含有复制原点［反向末端重复序列（ITR），定位在左右末端约 100bp 的位置］和包装序列（约 150bp，定位在与左端 ITR 紧连的区域）。

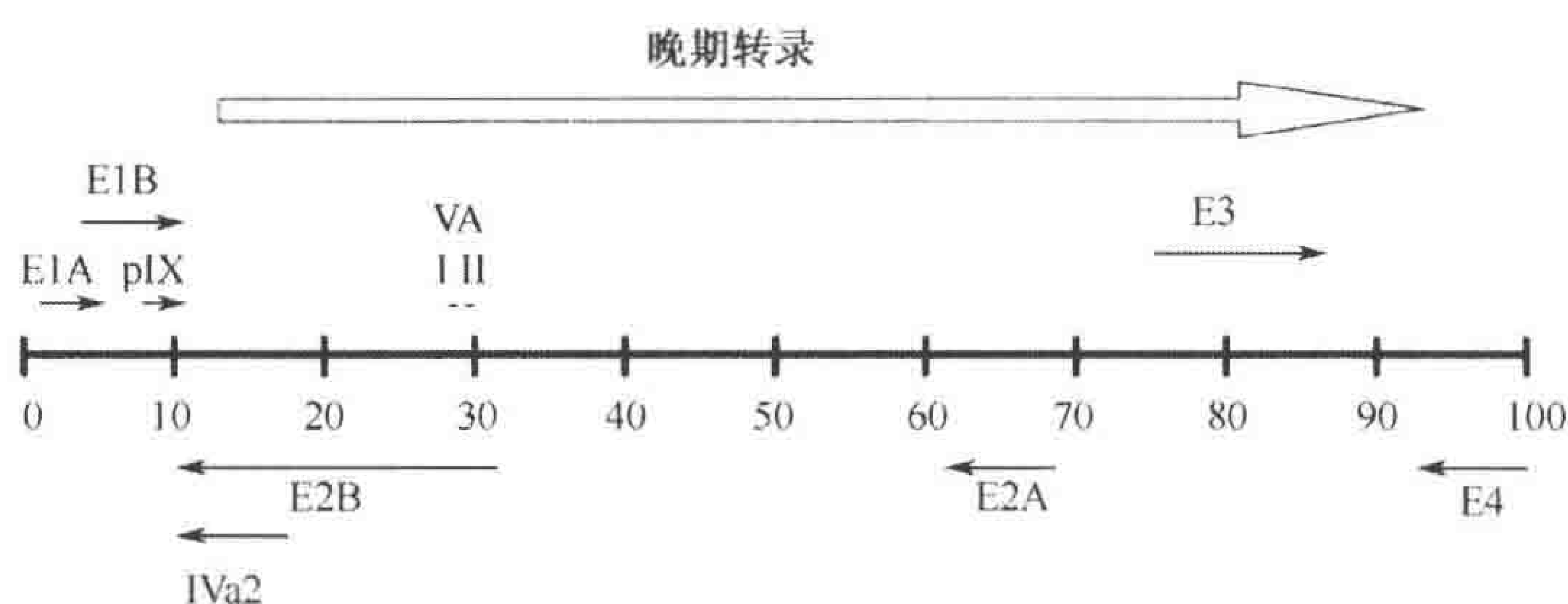



图 1．Ad5 基因组的简化的转录图。详细内容见正文。

大部分通常使用的 Ad 载体是 E1 缺失或第一代 Ad 载体（fgAd）。它有约 5kb 的克隆容量（Danthinne and Imperiale 2000）。通常，转基因插入到 E1 区域（图 1）。因为 E1 对于病毒复制是必需的，所以这些载体必须在 E1 补充的细胞系中扩增，如 293 细胞（Graham et al. 1977）、293N3S 细胞（Graham 1987）、911 细胞（Fallaux et al. 1996），或者 PER. C6（Murakami et al. 2002）。E3 区域在体外复制并非需要，删除 E3 的载体可以提高载体克隆容量到 8kb。目前，产生 fgAd 载体最有效的方法是构建易传染的 Ad 质粒到细菌中（Chartier et al. 1996；He et al. 1998）。这种方法使用重组通用（$RecA^{+}$）细菌转移转基因可读框到 Ad 基因组质粒，产生与最终构建病毒一致的 DNA 分子。转染可感染性质粒到 E1 补充的细胞系可以很高效率地产生恢复的重组 Ad 载体（He et al. 1998）。

商业化的 AdEasy 系统广泛地使用在重组介导的 Ad 载体构建上。这包括两种质粒的几种变体（表 1 和表 2）（He et al. 1998；He 2001）。穿梭质粒包括一个卡那霉素抗性（kan）可读框介于 E1 缺失的 Ad 载体基因组左右末端之间，一个多克隆位点，还有几 kb Ad5 E1 区域下游序列（称为右臂同源序列）。质粒骨架编码主要的 Ad5 基因组和 amp 抗性可读框。通过同源重组，转移 *kan* 抗性基因、左端 ITR 和包装序列，以及转基因从穿梭质粒到骨架质粒，产生感染性的重组 Ad 载体（图 2）。根据研究者的需要可选择穿梭质粒和载体，首先要考虑的是要使用的启动子、插入片段的大小和是否要了解载体行踪（表 2）。两个可选的 pAdEasy（Ad 基因组质粒）：pAdEasy-1 有完整的 E4 区

域，pAdEasy-2 是 E4 缺失型。删除 E4 可以提高质粒克隆容量，但是需要使用可表达 E4 的 911 或 293 系列细胞系。

**表 1．AdEasy 载体试剂盒成分和供应商**

| 供应商 | 试剂盒名字 | 编号 | 试剂盒成分 |
| --- | --- | --- | --- |
| ATCC | AdEasy 启动试剂盒 | JHU-23 | AdEasier-1 细胞（pAdEasy-1 的稳定转型） |
| | | | pShuttle |
| | | | pShuttle-CMV |
| | | | pAdTrack |
| | | | pAdTrack-CMV |
| | AdEasy 补充试剂盒 | JHU-24 | BJ5183 细胞 |
| | | | pAdEasy-1 |
| | | | pAdEasy-2 |
| | | | pAdEasy-1-GFP+β-gal（放大对照） |
| | | | pAdEasy-2-GFP+β-gal |
| Stratagene | AdEasy 腺病毒载体试剂盒 | 240009 | pAdEasy-1 |
| | | | pShuttle |
| | | | pShuttle-CMV |
| | | | pShuttle-CMV-*lacZ* |
| | | | BJ5183 电感受态细胞 |
| | | | XL10-Gold 超感受态细胞 |
| | | | pUC18（对照 DNA） |
| | AdEasy XL 腺病毒载体试剂盒 | 240010 | BJ5183-Adl 细胞（和 AdEasier-1 细胞相似） |
| | | | pShuttle |
| | | | pShuttle-CMV |
| | | | pShuttle-CMV-*lacZ*（放大对照） |
| | | | XL10-Gold 超感受态细胞 |
| | | | pUC18（对照 DNA） |
| | | | AD-293 细胞（Stratagene 293 细胞衍生物） |
| Qbiogene | AdEasy 基础试剂盒 | AES1001 | BJ5183 细胞 |
| | | | DH5α 细胞 |
| | | | pAdEasy-1 |
| | | | 感染 QBI（纯化的 E1/E3 剔除的腺病毒编码的 lacZ |
| | | | 磷酸钙转染试剂 |
| | | AES1000 | 基础的试剂盒组分 |
| | | | QBI-293A 细胞（Qbiogene 293 细胞衍生物） |
| | | AES1000A | 基础试剂盒组分 |
| | | | QBI-293 细胞 |
| | | | pShuttle |
| | | | pShuttle-CMV |
| | | AES1001A | 基础试剂盒组分 |
| | | | pShuttle |
| | | | pShuttle-CMV |

**表 2. 可用于 AdEasy 系统的穿梭质粒**

| 穿梭载体 | 大小/kb | 最大插入片段/kb[a] | 供应商[b] | GFP 示踪剂[c] | 注[d] |
|---|---|---|---|---|---|
| pShuttle | 6.6 | 1-7.5,2-10.2 | A,S,Q | 无 | 最大克隆容量;整个表达可读框连接到 MCS |
| pShuttle-CMV | 7.5 | i-6.6,ii-9.1 | A,S,Q | 无 | 转基因连接到 MCS 的 CMV 启动子和 poly A 之间 |
| pAdTrack | 8.3 | 1-5.9,2-8.6 | A | 有 | CMV 启动子调节 GFP 表达;整个表达可读框插入到 MCS |
| pAdTrack-CMV | 9.2 | 1-5.0,2-7.7 | A | 有 | CMV 启动子调节 GFP 和转基因首尾相连可读框;转基因连接到 MCS 的 CMV 启动子和 poly A 之间 |
| pShuttle-IRES-hrGFP-1 | 8.9 | 1-5.3,2-8.0 | S | 有 | 一个启动子调节双顺反子表达可读框的转基因和 GFP 表达;转基因克隆到 MCS 的 C 端 FLAG 抗原决定簇标签框架后,它介于 CMV 启动子和 poly A 之间 |
| pShuttle-IRES-hrGFP-2 | 8.9 | 1-5.3,2-8.0 | S | 有 | 一个启动子调节双顺反子表达可读框的转基因和 GFP 表达;转基因克隆到 MCS 的 C 端 HA 抗原决定簇标签框架后,它介于 CMV 启动子和 poly A 之间 |

a 最大插入片段大小根据穿梭载体重组 pAdEasy-1(完整的 E4;i)或 pAdEasy-2(E4 删除;ii)。

b 缩写:(A)美国典型培养物保藏中心;(S)Stratagene;(Q)Qbiogene。

c GFP 示踪:载体表达绿色荧光蛋白,可以在扩增中观察到,不需要斑点纯化。

d 缩写:多克隆位点(MCS);多腺苷酸信号(poly A);细胞巨化病毒中早期启动子/加速子(CMV)。

## 方案

# Ad 载体的构建和特征化

包括感兴趣的转基因的穿梭质粒可以通过标准的克隆程序产生。一旦获得,用 *Pme*I 线性化穿梭载体,与 AdEasy 骨架载体共转到 BJ5183 细胞系。从 BJ5183 小量纯化 DNA 后(不能维持高拷贝数的质粒),DNA 被转移到通用克隆体系,如 DH5a。一旦载体结构通过限制性内切核酸酶图谱确定,可采用 CsCl 梯度大量纯化克隆并特征化那些被纯化的 Ad 载体。问题与解决参见表 3。

**表 3. 问题与解决**

| 问题 | 可能原因 | 建议 |
|---|---|---|
| 共转 BJ5183 细胞后很少或者不出现克隆 | 共转染条件待优化 | 尝试使用其他更有效转染条件,如电转;尝试使用 AdEasier-1 细胞 |
| | 不正确的抗生素,或使用过多的 kan | 细胞铺 25μg/ml kan 的 1.5%琼脂糖 LB 培养板 |
| | 错误使用感受态细胞 | 确定使用的是 BJ5183 细胞 |
| | 感受态 BJ5183 细胞太少 | 检查感受态细胞,如果需要,做新的感受态细胞; |

续表

| 问题 | 可能原因 | 建议 |
| --- | --- | --- |
| | | 使用新的转染方法(如电转); |
| | | 购买商品化感受态细胞 |
| 共转染 BJ5183 之后出现过多的克隆 | *PmeI* 没有完全消化穿梭子 | 使用少的 DNA 更多的 *PmeI*(同时,确定 *PmeI* 有活性) |
| | | 琼脂糖胶电泳检测消化效率 |
| 初始转染后 293 细胞没有产生斑点 | *PacI* 没有完全消化 | 确保 *PacI* 有活性 |
| | | 琼脂糖电泳检测消化效率 |
| | 转染效率太低 | 通过使用不同量的 DNA 和转染试剂优化转染程序 |
| | | 使用另外的转染试剂或方法 |
| | 准备的 DNA 不合适 | 通过 CsCl 梯度离心准备 DNA |
| | | 确定 DNA 浓度 |
| | 293 细胞传代太多 | 溶解新的 293 细胞 |
| | Ad 载体骨架缺失 | 用不同限制性内切核酸酶消化分析质粒结构;<br>如果检测到缺失,做新的克隆 |
| | 插入片段超过 Ad 包装上限 | 参考表 2 |
| | 转基因产物有毒性 | 使用弱的可诱导启动子 |
| CsCl 梯度离心没有可见的病毒条带 | CsCl 溶液浓度不正确 | 通过称量 1ml 溶液确定浓度 |
| | 在条带梯度中 1.25g/ml 和 1.35g/ml CsCl 溶液有混合 | 1.35g/ml CsCl 上加 1.25g/ml CsCl 要小心;<br>确保慢速持续加入 1.25g/ml CsCl,确保两相不混合 |
| 没有检测到转基因表达 | 转基因或者启动子有突变 | 通过测序或酶切分析纯化的衣壳 DNA |
| | | 如果检测到错误,使用其他斑作为转基因表达 |
| | 转基因不能有效表达 | 检测启动子在使用的细胞系是否有活性 |
| | | 确定构建质粒包括 Kozak 序列和多聚腺苷酸序列 |
| | 纯化的病毒是 RCA | 检测在非补充细胞中复制,如 A549 |
| | | 如果病毒是 RCA,或 RCA 水平较高,再次纯化载体,从斑点纯化开始 |

## 材料

**注意**:标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

#### 琼脂糖(1% *m/V*)

溶解 1g 琼脂糖(UltraPure; Invitrogen,15510-027)到 100ml 无菌水中。121℃灭菌 20min。室温保存,使用前微波炉溶化。

#### 细菌

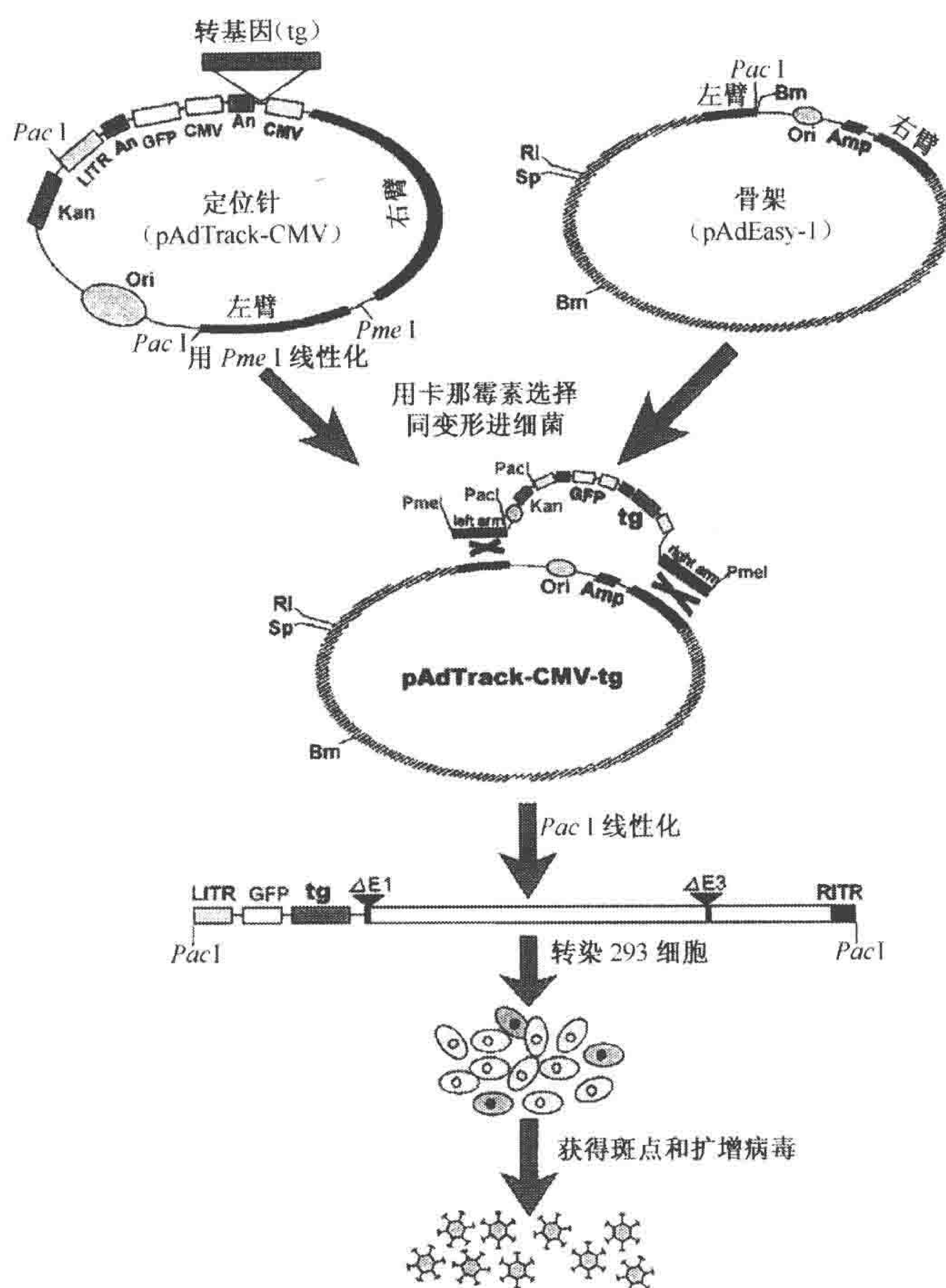



图 2. 图示 Ad 载体生产的 AdEasy 系统。详细内容见正文。(有修改，授权自 He et al. 1998 [@National Academy of Sciences])。

BJ5183 细胞 (RecA-精通型)

在商业化 AdEasy 试剂盒中可以提供，详细看表 1。

DH5a (RecA-缺失型；Invitrogen，18258-012)

制造感受态细胞，使用氯化铷方法，参见 Sambrook 等 (1989) 0.2ml 分装保存－80℃。

饱和酚溶液< !>

细胞系

低传代的 293 细胞 (Microbix；Toronto，Canada，PD-02-01)

A549 细胞 (ATCC；Manassas，Virginia，CCL-185)

培养 293 和 A549 细胞在 150mm 培养板，37℃，5% $CO_2$ 培养箱，90%汇和，1∶2 或 1∶3 传代。

293N3S 细胞 (Microbix，PD-02-02)

如上所述 150mm 培养板培养 293N3S 细胞。在悬浮培养基中悬浮培养细胞，70r/min 振动，

当细胞到$5\times10^5$个/ml时，1∶2或1∶3传代。

氯化铯<!>梯度溶液（1.25～1.35g/ml）

溶解分别溶解54.0g和70.4g固体氯化铯（Fisher Scientific，BP1595-1）到146ml和129.6ml透析液中。0.2μm滤器过滤。

氯仿<!>∶异丙醇<!>（24∶1，*V/V*）

1×柠檬酸钠

135mmol/L KCl<!>

15mmol/L柠檬酸钠<!>

去离子水溶解，121℃灭菌45min。

2×柠檬酸钠

270mmol/L KCl<!>

30mmol/L柠檬酸钠<!>

去离子水溶解121℃灭菌45min。

完全培养基

最少的必需培养基（MEM；Sigma-Aldrich，M2279）

10%胎牛血清（FBS；Sigma-Aldrich，F2442-500ml）

2mmol/L GlutaMAX（Invitrogen，35050-062）

透析缓冲液（10mmol/L Tris-HCl<!>pH8.0）

去离子水0.2μm滤膜过滤。

DNA酶I（Sigma-Aldrich，D-5025）

20mmol/L Tris-HCl（pH7.6）、50mmol/L NaCl、1mmol/L DTT<!>和50%甘油中溶解10mg/ml的DNA酶I。

EB<!>

异丙醇<!>

卡那霉素<!>（25μg/ml）

LB培养基

$MgCl_2$<!>（2mol/L）

121℃去离子水灭菌45min。

保持培养基

MEM（Sigma-Aldrich）

5%FBS（Sigma-Aldrich）

2mmol/L GlutaMAX（Invitrogen）

1×抗生素-抗真菌素（Invitrogen）

2×保持培养基

2×MEM（Invitrogen，11935-046）

10%FBS（Sigma-Aldrich）

2×抗生素-抗真菌素（Invitrogen）

PBS

137mmol/L NaCl

8.2mmol/L $Na_2HPO_4$< !>
1.5mmol/L $KH_2PO_4$< !>
2.7mmol/L KCl
去离子水溶解，121℃灭菌45min。
质粒：穿梭和骨架质粒（表1和表2）
限制性内切核酸酶
*Pac*I 限制性内切核酸酶（New England BioLabs，R0547L）
*Pme*I（New England BioLab，R05605）
克隆感兴趣基因到穿梭载体可能需要其他的酶。
RNase A< !>（10mg/ml；Sigma-Aldrich，R-4875）
NaCl（5mol/L）
去离子水溶解，121℃灭菌45min。
去氧胆酸钠< !>（5% *m/V*）
0.2μm 滤器过滤。
SDS-蛋白酶K溶液
10mmol/L Tris-HCl（pH7.4）
10mmol/L EDTA
1%SDS< !>（*m/V*）
1mg/ml 蛋白酶K< !>
SDS（0.1% *m/V*）-TE
溶解0.1g SDS到100ml TE。
蔗糖（40% *m/V*）
溶解40g蔗糖到100ml PBS溶液中，0.2μm滤膜过滤。
SuperFect 转染试剂（QIAGEN，301305）
1×TE
10mmol/L Tris-HCl（pH7.5）
1mmol/L EDTA
121℃去离子水灭菌45min。0.1×TE，$H_2O$ 稀释1×溶液121℃灭菌45min。
1×胰酶< !>-EDTA
PBS稀释10×溶液（Invitrogen，15400-054）。

## 仪器

离心机（Avanti J-25 I；Backman）和JLA 10.500 转子（Beckman）
热封口仪（如 Beckman Model 7700 Cordless Tube Topper）
血球仪（VWR International，15170-172）
培养箱（37℃，5%$CO_2$）
超净台
磁力搅拌器（5号，Bellco Glass，7785-D2005）
离心管（1.5ml）

移液管，去离子棉塞

1.5%琼脂胶的培养皿（粒状胶，Fisher Scientific，BP1423-500）25μg/ml 卡那霉素 LB 培养基。

Quick-seal（16mm×76mm 超速离心管；Beckman，344322）

Slide-A-Lyzer 透析盒（10 000kDa 分子质量，0.5～3ml；Pierce Rockford，Illinois，664250）

聚丙烯管（13ml 带帽的）

聚丙烯管（5ml）

带叶轮组片的搅拌瓶：250ml（Bellco Glass，1965-61002）和 3000ml（Bellco Glass，1965-61030）

注射器（3cc）装有 22 号针头

超速离心机（如 Beckman Optima XL-100K 超速离心机）

70.1 Ti 转子（Beckman）

SW 41 Ti 浮桶式转头（Beckman）

Ultra-Clear（14mm×89mm）超速离心管（Beckman，344059）

## 方法

操作 Ad 必须在达到生物安全水平 2 的实验室进行。专门 Ad 使用的超净台和培育箱。应该小心使用灭菌的仪器、试剂和方法。净化处理固体和液体废物，污染物表面进行消毒。

### 生产感染性的 Ad 质粒

1. 使用标准的克隆程序制作包含感兴趣转基因的穿梭载体。
2. 在总反应体系 20μl，用 1μl *Pme*I 消化 2μg 穿梭质粒，37℃过夜。
3. 加 3μl *Pme*I 消化的穿梭质粒和 3.3μl 0.1μg/μl 超螺旋 pAdEasy 到 13ml 有盖的聚丙烯管。加 3μl *Pme*I 穿梭载体不带 pAdEasy 到另一管作为阴性对照。冰上冷却。
4. 冰上融化两个 0.2ml 分装的 BJ5183 感受态细胞。
5. 加 0.2ml BJ5183 细胞到 DNA 上，冰上孵育 25min。
6. 42℃热激 90s，然后冰上放置 2min。
7. 每管加 1ml LB 培养基，225r/min，37℃，温箱孵育 25min。
8. 转移细菌到 1.5ml 离心管，8500*g* 室温离心 1min。
9. 去除 1ml LB 培养基，总量 0.2ml 重悬沉淀。
10. 加 0.1ml 到 1.5%琼脂胶 LB 25μg/ml 卡那霉素培养板上。一板做对照试验。

    在阴性对照板上应该没有克隆。但是，如果背景克隆不出现，重组克隆会明显的比没有酶切的穿梭质粒载体少。
11. 挑 4～8 个小克隆，小量碱裂解法纯化质粒 DNA。悬浮 DNA 到 25μl 0.1×TE 中。
12. 用 5μl DNA 和 100μl DH5α 重复步骤 5～10，而不是用 BJ5183。每板挑选两个克隆。

13. 小量碱裂解法纯化 DNA。

用不同的限制酶消化 DNA 来验证质粒结构。正确的克隆随后通过 CsCl 密度梯度离心，然后用于产生重组 Ad 载体（步骤 15）。

## 细胞准备

14. 准备用于转染的培养细胞

**准备贴壁的 293 和 A549 细胞**

a. 从培养 293 或 A549 的 150mm 培养板中去除培养基。

b. 用 5ml 1×柠檬酸钠（293 细胞）或 2ml 胰酶-EDTA（A549 细胞）冲洗单层细胞两次。

c. 对于 293 细胞，第二次冲洗之后，去除其余液体，只留下 0.5ml 的柠檬酸钠 22℃在培养板上 5～10min，直到细胞脱离培养板。A549 细胞，2ml 胰酶-EDTA 37℃孵育 5min，直到细胞开始脱落。

d. 拍打培养板壁，脱落细胞。

e. 取细胞到 12ml 完全培养基，分装到新的培养板。

孵育培养板，使细胞在转染前 90%汇合度。

**准备 293N3S 细胞悬液**

a. 转移 6 个长满的 150mm 培养板 293N3S 细胞到 3L 的搅拌培养器中，加维持培养基到 1L。

b. 每隔 1～2d，转移 2ml 悬浮细胞到 15ml 聚丙烯锥形管中。

c. 加 2ml 的 2×柠檬酸钠，强烈振荡 10s。

d. 37℃孵育细胞 15min。

e. 强烈振荡 10s。

f. 血清仪细胞计数。

如果细胞成团难计数，继续 37℃培育振荡，直到细胞散开。

g. 当细胞浓度超过 $4\times10^5$ 个/ml，加 1L 保持培养基，直到细胞密度为 $3\times10^5$～$5\times10^5$。

## 转染和再生 Ad 载体

15. 用 2μl *Pac*I 消化编码重组 Ad 基因组的 10μg 质粒，反应体系 50μl，37℃过夜。
16. 混合 40μl *Pac*I 消化的 DNA 与 360μl MEM 和 16μl SuperFect 试剂到圆底的 5ml 聚丙烯管中。

    除了 SuperFect 可以选用其他的转染试剂。
17. 强烈振荡 10s。室温放置 15min，形成复合物。
18. 加 2.4ml MEM 到包含 DNA-SuperFect 复合物中。吹吸混合。
19. 2ml PBS 冲洗 293 细胞接种的 35mm 板两次。
20. 转移 0.7ml 质粒混合物悬液到 35mm 293 细胞板。
21. 37℃，5% $CO_2$ 孵育细胞 3h。
22. 大概 2.5h 后，微波炉中溶化 1%（*m*/*V*）琼脂糖溶液（每 35mm 板最少 1.5ml）。水浴 42℃平衡。

23. 平衡 2×维持培养基（每 35mm 培养板 1.5ml）37℃。
24. 3h 后，从转染细胞中去除转染液，用 1ml PBS 冲洗单层细胞。
25. 混合等量的琼脂糖胶溶液和 2×维持培养基。加 3ml 到每一个 35mm 板 293 细胞中。

    这一步必须快，避免琼脂糖胶固化，但是要轻，避免分散单层细胞。

26. 允许覆盖固化（约 15min，22℃）返回细胞到培养器中。
27. 孵育直到形成斑（7～12d）。
28. 选择几个分离好的斑。使用灭菌的移液管去除斑上琼脂糖塞。每个塞放到 4%蔗糖 PBS 瓶中。轻轻振荡，−80℃保存。

    起始的 Ad 斑分离需要进行二次斑纯化（步骤 22～28）以确保病毒形成单克隆。

## 分析扩增斑分离的 Ad 载体

29. 如上得到的每个纯化的斑载体，加 100μl 到两个 35mm 长 293 细胞板上（90%汇合），细胞重新放回培养箱。
30. 允许病毒吸收 1h，每 10～15min 摇晃培养板。
31. 过了吸收期，加 2ml 的维持培养基每板，放回到培养箱中。
32. 检测每板细胞病变效应（CPE）。

    细胞应该圆球形或从培养板上脱落。用一个培养板分析重组 Ad 结果。保留其他培养板成分用于扩增。

## 分析斑点分离的 Ad 载体

a. 一旦得到完全 CPE，在超净台中静置 10min，使脱落细胞沉淀到底部。
b. 小心去除培养基。用 0.2ml 的 SDS-蛋白酶 K 溶液重悬细胞。转移细胞悬液到离心管中。
c. 孵育裂解液 37℃过夜。
d. 加 0.3ml TE 到裂解液中。用 0.5ml 饱和酚溶液抽提，随后用 0.5ml 氯仿：异丙醇抽提。
e. 加 0.1ml 5mol/L NaCl 和 0.5ml 异丙醇。
f. 4℃，20 000*g* 离心 10min 沉淀 DNA。
g. 20～50μl TE 重悬 DNA，取 5～10μl 用适当的限制性内切核酸酶消化。
h. 电泳检测结果条带在 0.8%琼脂糖上，随后 EB 染色。

**扩增斑点分离的 Ad 载体**

a. 一旦得到完全的 CPE（步骤 32），从培养板上刮取细胞到完全培养基中，转移到 4ml 的冷冻管中。
b. 加 40%蔗糖 PBS 到终浓度 4%。轻轻振荡。立即使用或者保存−80℃备用。
c. 用 1ml 接种 150mm 293 培养板，细胞放回培养箱培养。
d. 病毒吸收 1h。每 15min 振荡培养板。
e. 过了吸收时期，加 20ml 维持培养基到每板，培养箱中培养。
f. 检测 CPE。一旦 CPE 确定，转移细胞和培养基到 50ml 冻存管。加 1/10 量的 40%蔗糖 PBS 到终浓度 4%蔗糖，−80℃保存。

## 大量准备 Ad 载体

33. 融化接种体 22℃水浴。如果需要，可以提高接种体量到 30ml MEM。

**用于贴壁细胞 293 大量准备 Ad 载体**

a. 从 30 个 150mm 培养板的 293 细胞中去除培养基（感染时约 90%融和），每次 10 个，1ml 接种体重新接种。

b. 37℃，5%$CO_2$孵育 1h 病毒吸收，每 10～15min 振荡。

c. 加维持培养基 20ml，细胞培养箱中培养。

d. 每天检测细胞，直到出现 CPE（2～3d）。

e. 转移细胞和培养基到两个 500ml 的聚丙烯瓶中。

大部分细胞应该在培养基中脱落；没有脱落的细胞可以振荡细胞瓶脱落细胞。

f. 使用相同的枪头冲洗 10 个培养板两次用 10ml 的 PBS。

g. 4℃，650$g$ 离心细胞 20min。倒出培养基，保留细胞沉淀。

h. 用 3ml 4%蔗糖 PBS 重悬细胞，转移到 50ml 冻存管中。

i. 使用相同的吸液管用 2ml 4%蔗糖 PBS 冲洗瓶 1 次，再一次用 4～5ml 的蔗糖 PBS。

细胞沉淀总量应该在 15ml。细胞或者直接载体纯化，或者−80℃保存。

**使用悬浮的 293$N_3$S 细胞大量生产 Ad 载体**

a. 分装 3L 搅拌培养器的 293$N_3$S 细胞到 8 个 500ml 离心瓶中。

b. 室温 650$g$ 离心 20min。倒培养基到 1L 灭菌瓶中。

保留 1L 用尽培养基，加入到 3L 的搅拌器中。培养箱培养。

c. 使用用尽培养基悬浮细胞沉淀，终浓度在 40ml。转移悬液到 250ml 搅拌器中。用 10ml 用尽培养基洗两次，转移到搅拌培养器中。

d. 加融化的接种子到培养器中。

容器中总量应该在 100ml。

e. 转移细口瓶到培养箱，70r/min 搅动细胞 2h。

f. 转移细胞到包含 1L 用尽培养基的 3L 悬浮培养瓶中。用 250ml 新鲜维持培养基冲洗 250ml 搅拌培养瓶 2 次，转移到 3L 的搅拌培养瓶中。加 500ml 新鲜维持培养基到终浓度约 2L。

g. 转移 2ml 的悬浮细胞到 35mm 培养板，放置 37℃，5%$CO_2$培养箱。

细胞应该重新贴壁到培养板。

h. 放回悬浮培养瓶到培养箱。

i. 当 35mm 培养板出现完全的 CPE 时（2～3d 后），倒出悬浮培养基到 500ml 离心瓶中。

j. 4℃，650$g$ 离心 20min。倒去培养基，保留细胞沉淀。

k. 用 3ml 4%的蔗糖 PBS 重悬细胞，转移到 50ml 的锥形管中。

l. 使用相同的移液器用 2ml 的 4%蔗糖 PBS 冲洗瓶一次，4～5ml 4%蔗糖 PBS 冲洗一次。

细胞悬液总量大约 15ml。细胞或者直接进行载体纯化或者保存在−80℃。

## 载体纯化

34. 37℃水浴融化两种方法大量准备的 Ad 载体沉淀。

    以下介绍的细胞沉淀液总量 15ml，根据实际量进行放大或缩小。

35. 加 1.5ml 5%去氧皮质酮到沉淀。经常颠倒混合孵育 22℃，30min。

    裂解液为浓的高度黏稠液体。

36. 加 0.3ml 2mol/L $MgCl_2$、0.15ml 10mg/ml RNA 酶 A 和 0.15ml 10mg/ml DNA 酶 I。37℃孵育，偶尔颠倒混合，30～60min。

37. 一旦黏稠的裂解液接近水，22℃，1000*g* 离心 10min。

38. 准备 CsCl 梯度离心，使用 Ultra-Clear 超速离心管（每病毒 2 个管）。

    a. 每管加 2ml 1.35g/ml CsCl。

    b. 小心（如用稳定流速，速率约 30s/ml）在上层加入 1.25g/ml CsCl。

    c. 小心加等量澄清裂解液（6.5～7ml）每管。

    d. 平衡每管，转移到 SW 41 转子离心机内。

39. 使用慢加速和减速程序（500r/min 大于 5min）离心样品 10℃，35 000r/min 离心 1h。

    病毒条带是梯度中最低可见条带，在梯度 1.25～1.35g/ml 层。

40. 使用 3cc 针管和 22 针头插到管大约病毒条带下 1cm。轻轻倾斜，使针头平行条带慢慢移动，条带降低，针头降低。

    两个梯度管的病毒可以合并到单一的 Quick-Seal 超速离心管中。

41. 充满包含病毒的 Quick-Seal 管到瓶颈用 1.35g/ml CsCl。使用热封口来封口 Quick-Seal 管。

    准备平衡管使用 1.35g/ml CsCl 充满 Quick-Seal 管到瓶颈。

42. 35 000r/min 离心用 70.1 Ti 转头最大加速最大减速 10℃过夜。

43. 刺穿封口的 Ti 管盖，形成空气入口。使用 3cc 和 22 号针头刺穿管在病毒下 1cm。倾斜成斜面，使它平行条带，慢慢移动，条带降低，降低针头。

    小心，最小量提取。

44. Ad 注入准备好的透析盒中。用针头去除空气。

45. 用 500ml 透析缓冲液 4℃透析 Ad 载体 24h。

46. 从透析盒中转移载体。保留注射器和 0.9ml 透析缓冲液。

47. 加 40%蔗糖 PBS 到载体中，以及终浓度 4%的透析液。保存纯化载体小量分装（100～200μl）－80℃和缓冲液在－20℃。

    Ad 载体储存液在－80℃稳定数年。

## 鉴定纯化的 Ad 载体

48. 进一步鉴定 Ad 载体通过分析基因组结构、检测滴度、检测是否有复制能力的完全腺病毒（RCA）污染。

    **确定纯化的 Ad 载体基因组结构**

    a. 冲洗从裂解液中转移载体的注射器，使用 0.2ml SDS-蛋白酶 K。转移液体到

1.5ml 的离心管中。

b. 37℃孵育过夜。

c. 加 0.3ml TE 到裂解液中。用 0.5ml 缓冲液饱和酚，随后 0.5ml 氯仿：异戊醇提取。

d. 加 0.1ml 5mol/L NaCl 和异丙醇。

e. 4℃，20 000*g* 离心 10min 沉淀 DNA。

f. 用 20～50μl TE 重悬 DNA，取 5～10μl 用适当的限制性内切酶消化。

g. 0.8%琼脂糖电泳检测酶切条带，随后 EB 染色。

**确定感染单位滴度，通过使用斑形成单位（pfu）分析**

a. 准备在 MEM 中系列稀释的 Ad 载体（$10^{-4}$～$10^{-9}$）。

b. 用 0.1ml 每个分装稀释液感染 6 孔板中的 293 细胞（约 90%汇和），细胞放回到培养箱。

c. 病毒吸收 1h，每 10～15min 振荡培养板。

d. 过了吸收期，如前所述铺琼脂胶。

e. 孵育 10～12d，计数斑点。

每孔斑点数量乘以稀释因子决定载体滴度 pfu/ml。

**用粒子/ml 测定载体滴度**

a. 用 1ml 0.1% SDS-TE 稀释 20～50μl 纯载体到终体积 1ml。
使用透析缓冲液（步骤 46 中）作为空白对照。

b. 56℃孵育 10min，轻轻振荡，轻轻离心。

c. 测定 $OD_{260}$。

d. 计算数量粒子/ml，野生型 Ad 消光系数 $1.1\times10^{12}$（Maizel et al. 1968）：

$$(OD_{260})(\text{稀释因子})(1.1\times10^{12})$$

如所述标准的 Ad 载体应该粒子数对 pfu 比例大概在 10（Mittereder et al. 1996）。

**检测在准备的纯化载体中是否有 RCA 存在**

载体 DNA 和 293 细胞或 911 细胞中的 Ad5DNA 重组可能会导致转移 E1 到载体上（Lochmuller et al. 1994），产生 RCA。A549 不能表达 E1 从而不能有效地支持 E1 缺失的载体复制。因此，用纯化的 Ad 转染，一旦污染有 RCA，会在 A549 细胞中引起 CPE。

a. 用 250μl MEM 溶解的 $10^6$ pfu 感染 60mm 板的 A549 细胞（90%汇合）。另一个 60mm 培养板用 $10^7$ pfu 250μl MEM 溶解。用 1ml MEM 溶有 $10^8$ pfu 载体感染 150mm 培养板。细胞放回培养箱培养。

b. 病毒吸收 1h，每 10～15min 振荡培养板。

c. 过了吸收期，加 5ml 或者 20ml 维持培养基每板，放回培养箱。

d. 一旦有明显 CPE 或者 7d 后，通过刮取细胞到培养基收获单层，加 40%蔗糖 PBS 到终浓度为 4%蔗糖，保存在−80℃。

e. 使用 1ml 培养基溶解收获的病毒感染单独的 150mm A549 培养板。加 1ml MEM 到第四板作为阴性对照。

f. 病毒吸收 1h，每 10～15min 振荡培养板。

g. 过了吸收期，加 20ml 维持培养基到每板，放回到培养箱。

h. 观察是否形成 CPE 每天对照感染细胞和未感染的对照。如果需要，每 5d 更换培养基。

如果出现明显的 CPE（通常会转染约 14d 后出现），RCA 存在于纯化的储存液中。RCA 对 pfu 的相对量可以通过对比 3 个感染板上的 CPE。

i. 从出现 CPE 的培养板上提取 DNA。限制酶消化琼脂糖电泳分析。

左边末端的 RCA 基因组会有结构与野生型 Ad 相同，因为有 E1 存在。

## 致谢

作者感谢 Robert Lanthier 详细严格阅读草稿。Park 实验室的研究受到加拿大健康研究所（CIHR）和基因与细胞治疗的 Jesse Davidson 基金资助，一个 CIHR/肌肉营养不良/肌肉强直性萎缩加拿大合作者 Grant 和首席杰出研究奖获得者 R. J. P. 是 CIHR 新的研究者。P. J. R. 受国家科学和工程研究协和研究生奖学金资助。

## 参 考 文 献

Amalfitano A. and Parks R.J. 2002. Separating fact from fiction: Assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2:** 111–133.

Chartier C., Degryse E., Gantzer M., Dieterle A., Pavirani A., and Mehtali M. 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **70:** 4805–4810.

Danthinne X. and Imperiale M.J. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: A review. *Gene Ther.* **7:** 1707–1714.

Fallaux F.J., Kranenburg O., Cramer S.J., Houweling A., van Ormondt H., Hoeben R.C., and van der Eb A.J. 1996. Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **7:** 215–222.

Graham F.L. 1987. Growth of 293 cells in suspension culture. *J. Gen. Virol.* **68:** 937–940.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., and Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36:** 59–74.

He T.-C. 2001. Adenoviral vectors. In *Current protocols in human genetics* (ed. N.C. Dracopoli et al.), pp. 12.4.1–12.4.21. John Wiley & Sons, New York.

He T.-C., Zhou S., da Costa L.T., Yu J., Kinzler K.W., and Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 2509–2514.

Lochmuller H., Jani A., Huard J., Prescott S., Simoneau M., Massie B., Karpati G., and Acsadi G. 1994. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (ΔE1 + ΔE3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* **5:** 1485–1491.

Maizel J.V., Jr., White D.O., and Scharff M.D. 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* **36:** 115–125.

Mittereder N., March K.L., and Trapnell B.C. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* **70:** 7498–7509.

Murakami P., Pungor E., Files J., Do L., van Rijnsoever R., Vogels R., Bout A., and McCaman M. 2002. A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. *Hum. Gene Ther.* **13:** 909–920.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

# 第十六章　辅助病毒依赖的腺病毒载体的生产和鉴定

Donna J. Palmer 和 Philip Ng

Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030

古同军和许严伟　译



## 摘要

这一章详细地讲述了用于基因转染和基因治疗中的辅助病毒依赖性腺病毒载体（HDAd）的制备、扩增和大规模生产。在这一过程中，使用了适合悬浮培养的 116 生产细胞、AdNG163 辅助病毒和基于 p△28E4 骨架的辅助病毒依赖性病毒。到目前为止，本文讲述的改进方法和试剂是用于高通量、高质量生产 HDAd 的最有效的方法和试剂。本文同时讲述了使用标准分子生物学技术来特征化 HDAd 的物理滴度，辅助病毒的污染和基因组的结构。

## 引言

HDAd（也被称为无肠、微小、完全缺失、高容量、△、假）不含有所有编码病毒的序列，而保留了早期 Ad 载体的优点，如高效的体内转导和高水平的转基因表达。但是，缺乏病毒表达的被转导的细胞在缺乏慢性毒性的条件下可允许转基因长期地表达。而且，去掉病毒的序列使得载体具有克隆大约 37kb 序列的能力，因此可以运输完整的

基因序列、多个转基因和大片段的顺式作用元件，从而能增强、延长和调节转基因的表达。此外，载体基因组能以体外的方式在被转导的细胞中存在，所以由种系传递和插入突变导致原癌基因转化的危险可以忽略不计。现在已有很多介绍 HDAd 不同方面的优秀文章（Kochanek 1999；Parks 2000；Parks and Amalfitano 2002；Ng and Graham 2004；Palmer and Ng 2005）。

因为 HDAd 不含有病毒的编码序列，因此需要辅助病毒来繁殖（Parks et al. 1996）。首先将 HDAd 构建成细菌质粒。质粒形式的 HDAd（pHDAd）被限制性内切核酸酶消化，释放出 HDAd 基因组，转染 293 细胞系（Graham et al. 1977），此细胞系表达噬菌体 P1 位点特异性的重组酶 Cre。接着用辅助病毒转染这些被转染的细胞，这个辅助病毒具有两端与 loxP 位点相连的包装信号（ψ）。由 Cre 介导的两个 loxP 位点间的重组导致 ψ 的切割，使辅助病毒的基因组不能被包装，但仍然能够复制且反式辅助 HDAd 复制和包装（图 1），随着一系列的 HDAd 和辅助病共转染 293Cre 细胞，HADd 的滴度越来越大，最后由 CsCl 超速离心来纯化。

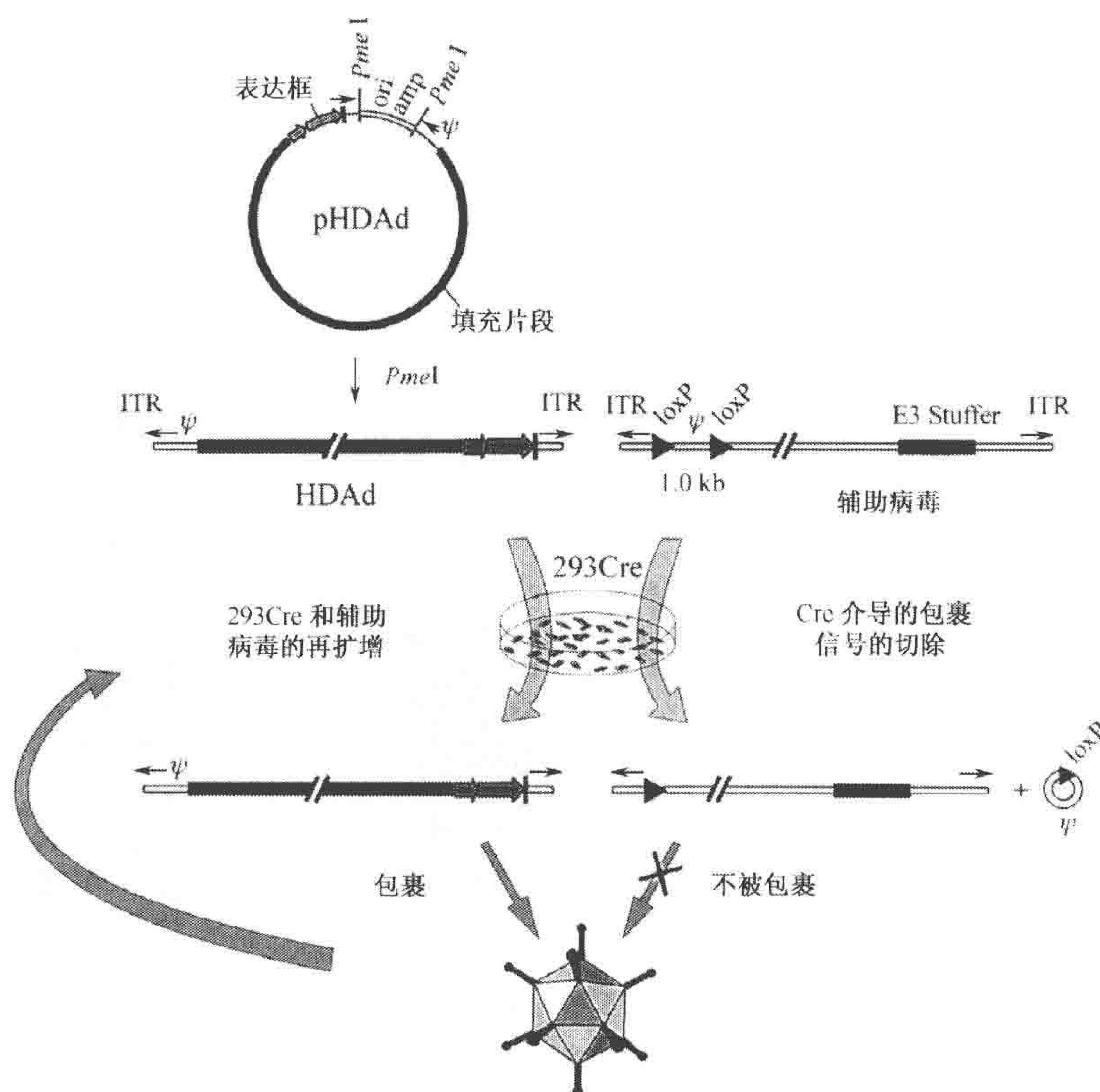



图 1. 用于生产 HDAd 的 *Cre/loxP* 系统。HDAd 只含有约 500bp 的顺式 Ad 序列，此序列用于 DNA 复制（ITR）和包装（ψ），剩下的部分是所要的转基因和非 Ad 的填充序列。HDAd 基因组被构建成一种细菌质粒并被限制酶（如 *Pme*I）消化释放出来，继而被转染到能表达 Cre 的 293 细胞系，接着被含有与 *loxP* 位点相连的包装信号 ψ 的辅助病毒感染。由 Cre 介导的对 ψ 的切割使得辅助病毒不能包装，但仍然能够复制和为 HDAd 繁殖提供必需的反式作用因子。随着一系列的 HDAd 和辅助病的共感染，HADd 的滴度将被增加。

许多因素影响 HDAd 的生产效率（Ng et al. 2002a；Palmer and Ng 2005）。用 pHDAd 有效地转染生产细胞系是非常关键的。转染率越高，达到最大 HDAd 滴度所需要的共转染的次数就越少，用于每次转染的辅助病毒的用量也非常关键。为了使每个细胞产量最大，最佳辅助病毒的用量必须最少，且被瞬间感染的生产细胞不会影响它们扩增载体的能力（Ng et al. 2001）。HDAd 的本身特点也具有重要作用。如果 HDAd 具有超出最佳包装大小（27.7～37.8kb）的基因组，这将明显地影响扩增，导致重排（Bett et al. 1993；Parks and Graham 1997）。同样，如果 HDAd 含有重复序列或者不稳定元素，或者 HDAd 含有与辅助病毒之间的同源序列，将在载体扩增时发生重排，因此需要避免这种情况。其他影响因素有：表达盒的特性，可能会与生产细胞的生长不相容（如表达有毒的或其他干扰产物）；或与填充序列不相容（Parks et al. 1999）。位于 HDAd 骨架的没被鉴定的可读框也是一种影响因素。这一章将着重讲解基于p△28E4的骨架，使用 116 细胞系（Palmer and Ng 2003）和辅助病毒 AdNG163（Palmer and Ng 2004）生产和特征化 HDAd 的方法，这些结果可能会随着试剂的不同而不同。

## 方案1

## 营救、扩增、大规模生产辅助病毒依赖性载体

HDAd 的生产可以分三部分（图 2，见彩版）：①营救，包括将 pHDAd（质粒形式）转化成 HDAd（病毒形式）；②扩增，随着连续的 HDAd 和辅助病毒的共转染生产细胞，HDAd 越来越多；③大量生产 HDAd。

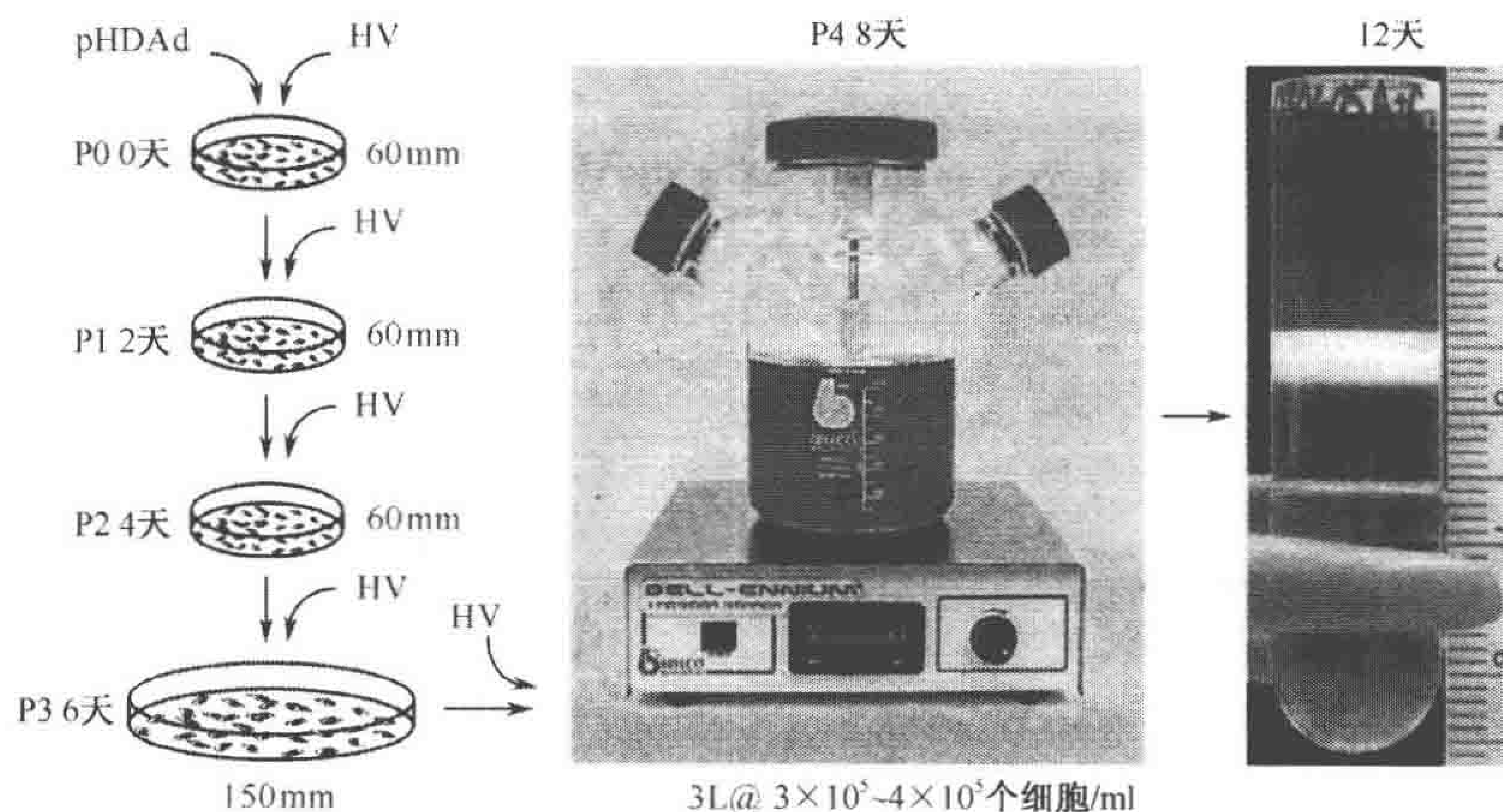



图 2. 营救（过程 0 或者 P0），扩增（P1～P3）和大规模（P4）生产 HDAd 流程图。将 pHDAd 转染到生产细胞，接着感染辅助病毒（P0）。接下来的过程包括，用适量的 HDAd 和辅助病毒共感染生产细胞。整个过程在 2 周内就能得到高于 $10^{13}$ 病毒颗粒（vp）/3L 培养菌和多于 10 000vp/个细胞的特异的产量。用 CsCl 梯度超速离心扩增的载体。（HV）辅助病毒；（pHDAd）HDAd 质粒。

## 材料

**注意**：标记< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

116 细胞系

这些细胞是 293 的细胞系的后代，能够高表达 Cre，单层生长或者悬浮生长。

AdNG163 辅助病毒（HV；图 3A）。

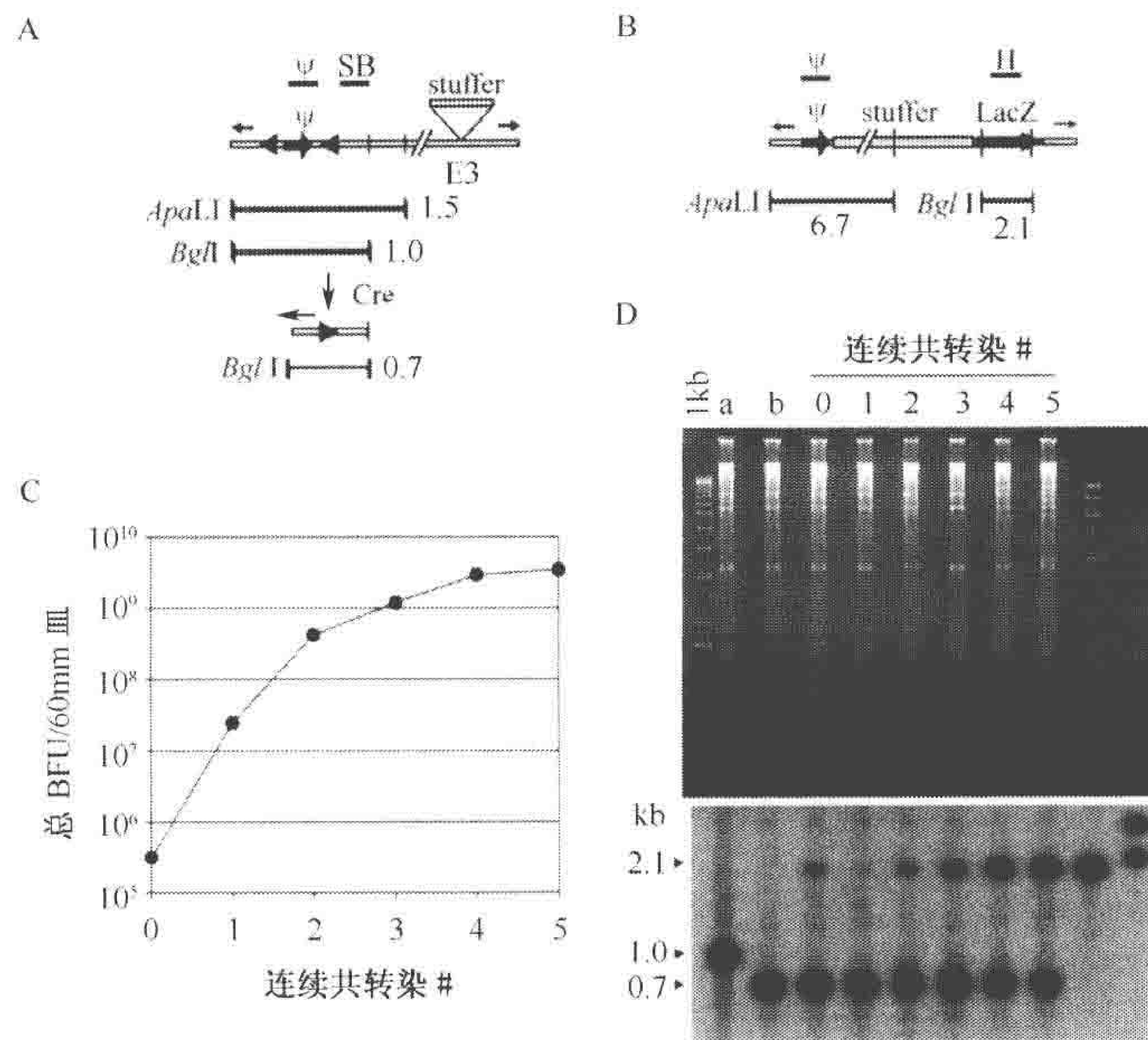



图 3. A. 辅助病毒 AdNG163 是第一代腺病毒（E1 切除），包含一个 ψ，其两侧为 *loxP* 位点。同时在野生型的 E3 区插入了一个 DNA 填充序列用以避免可复制腺病毒的产生。在 Cre 介导的 ψ 切除之后，1kb 的 *BglI* 片段减小到 0.7kb。相关限制酶酶切片段大小，用来进行 Southern 分析的探针 ψ 和辅助病毒特异性探针 SB 的位置在图中都有标示。（小三角形）*loxP* 位点；（小平行箭头）病毒 ITR。B. HDAdHD△28E4LacZ 包含一个 MCMV-*lacZ* 表达盒。相关酶切片段大小以及用于 Southern 分析的探针 ψ 和 HDAd 特异性探针 H 在图中都有标示。（小三角形）*loxP* 位点；（小平行箭头）病毒 ITR。C. 使用 116 细胞和 AdNG163 细胞扩增 HD△28E4LacZ 。每一个 60mm 平皿的蓝斑中的 HD△28E4LacZ 总产量在每次连续传代培养中有 X-gal 着色，由测定 293 细胞中的滴度来决定。D. HD△ 28E4LacZ 和 AdNG163 共转染 116 细胞。从每次被共转染的细胞中提取总 DNA（泳道 0～5）并用 *BglI* 消化。（泳道 a）AdNG163 感染的 293 细胞；（泳道 b）AdNG163 感染 116 细胞；（泳道 c）*BglI* 和 *PmeI* 消化的 HDAd 质粒 p△28E4LacZ ；（泳道 d）*AvaII* 消化含有探针 SB 和 H 片段的质粒。包含探针 SB 的 2.3kb 片段和包含探针 H 的 3.1kb 片段。（上侧电泳图）EB 染色琼脂糖凝胶电泳。HDAd 特异带在泳道 3～5 中可见。（下侧电泳图）蛋白质印迹同时与探针 SB 和 H 进行杂交。含一个包装信号（1kb *BglI* 片段）的辅助病毒基因组没有检测到，说明最小的协助病毒污染。每一步的传代 HDAd 特异带亮度增强。在这个例子中，用 p3 做接种体进行大规模 HDAd 生产，但是每一次的扩增会有不同。

$CaCl_2$（2.5mol/L）<！>

用0.2μm滤膜过滤除菌，用密封锥形管分装，4℃保存。

氯化铯梯度溶液（1.25g/ml和1.35g/ml）<！>

对于1.25g/ml和1.35g/ml溶液，分别将54.0g和70.4g的固体CsCl加入到146.0ml和129.6ml透析缓冲液中，再用0.2μm过滤器过滤。取其中1.00ml用于检测浓度。

2×柠檬盐

270mmol/L KCl<！>

30mmol/L 柠檬酸钠<！>

用高压灭菌锅在121℃灭菌45min。

透析缓冲液（10mmol/L Tris-HCl，pH8.0）<！>

用高压灭菌锅在121℃灭菌45min。

DNA酶I

准备10ml含有20mmol/L Tris-HCl和100mg牛的胰腺DNA酶的溶液（pH7.4）、50mmol/L NaCl、1mmol/L DTT<！>、0.1mg/ml牛血清白蛋白、50%（*V/V*）甘油，保存在－20℃。

乙醇（70%和95%，*V/V*）<！>

溴乙啡啶<！>

胎牛血清（FBS），热失活

L-谷氨酰胺

甘油

121℃高压灭菌45min除菌。

HDΔ28E4LacZ

该HDAd载体包含一个mCMV-*lacZ*表达盒

HEPES缓冲盐水（HBS）

21mmol/L HEPES

137mmol/L NaCl

5mmol/L KCl

0.7mmol/L $Na_2HPO_4$<！>

5.5mmol/L 葡萄糖

用NaOH<！>调节pH至7.1，再用0.2-μm的滤器过滤除菌。滤液4℃储存于紧密封严的塑料管中。HBS溶液的pH对转染效率极为重要。

潮霉素<！>

氯化镁（2mol/L）<！>

121℃高压灭菌45min。

最低必需培养基（MEM；Invitrogen 61100）

$PBS^{++}$（磷酸缓冲盐水）

在PBS中加入0.01体积68mmol/L的灭菌的 $MgCl_2$ 和0.01体积的 $CaCl_2$。

青霉素<！>/链霉素<！>

pHDAd

链霉蛋白酶溶液

用10mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 溶液制备20mg/ml链霉蛋白酶溶液。该溶液于56℃保温15min，再于37℃保温1h，并储存在−20℃。

链霉蛋白酶-SDS溶液

用含0.5%的SDS<!>，10mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 及10mmol/L EDTA (pH8.0) 的溶液配置0.5 mg/ml的链霉蛋白酶溶液

RNase A <!> (10mg/ml)

鲑鱼精DNA (2μg/μl，溶于TE缓冲液)

脱氧胆酸钠<!> (5% *W/V*)

用0.2μm的滤器过滤除菌。

蔗糖溶液 (40% *W/V*)

用0.2μm的滤器过滤除菌

TE

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA (pH 8.0)

121℃高压灭菌45min除菌。

Tris-HCl (100mmol/L, pH 8.0)

病毒裂解缓冲液

在TE缓冲液中加入SDS至终浓度为0.1% (*W/V*)。

## 仪器

贝克曼SW 40 Ti转头和超净离心管 (342413)

贝克曼SW 35转头和超净离心管 (344057)

培养皿 (60 mm和150 mm)

电磁搅拌 (Bellco Glass 7785-D200)

Slide-A-Lyzer透析卡 (Pierce 66381)

Southern印记杂交材料和试剂

光谱计和样品池

转动烧瓶 (Bellco Glass公司)：250ml (1965-61002) 和3L (1965-61030)

# 方法

## 单层培养116细胞系

116细胞培养在150mm的培养皿中，加入MEN和10%热灭活的FBS、0.1mg/ml潮霉素、100U/ml青霉素/链霉素和2mmol/L L-谷酰胺。当细胞达到90%汇合度时，将细胞分成两份（每2天）或者三份（每3天）。记得在使用前将培养基加热到37℃。

1. 去除培养基。
2. 轻敲培养皿的一边来分离细胞。
3. 取适量容积的新鲜培养基，将细胞悬浮在其中，并将温度控制在37℃，放于新

的培养基中。

一般情况下，在分离细胞 2d 后，转染 116 细胞以保证充分接触细胞。一个铺满 150mm 培养皿的 116 细胞能够分成 20 个 60mm 培养皿来培养。

## 制备 HDAd

首先构建 pHDAd。我们使用传统的分子生物学方法，将感兴趣的表达盒插入到 p△28E4。为了能够有效地包装，HDAd 的基因组需要为 37.8～27.7kb（Bett et al. 1993；Parks and Graham 1997）。在 HDAd 基因组的其他地方不能含有用于将 HDAd 从质粒上切割下来的限制性内切核酸酶的位点。关于 HDAd 设计的其他方面，请参考前言部分。高质量的 DNA 质粒对于载体的高效制备很关键，因此我们使用 CsCl 超速离心来纯化质粒（Ng et al. 2002b）。下面的步骤是关于制备和扩增 HDAd 的。如果要扩大规模，需要增加相应的载体。

4. 将 116 细胞分到 60mm 培养皿（每个培养皿一个载体）中，2d 达到 70％汇合时转染。在转染前 1h，去除培养基，加入 5ml 新的 MEM 和 10％FBS。
5. 在 25～50μl 体积里面，使用适当的限制性内切酶消化 10μg pHDAd。
6. 在 65℃，培育 20min。
   a. 立即使用消化好的 DNA 或者保存在 4℃，第二天使用。
   b. 用琼脂糖凝胶电泳检验 0.5μl 消化后的 DNA，同时用溴化二氨乙苯啡啶染色。

   完全的消化应该只产生两条带：HDAd 基因组和病毒质粒序列。
7. 通过聚苯乙烯管将 5μg 鲑鱼卵 DNA 加到 0.5ml HBS 缓冲液中。用最大的速度搅拌 1min。
8. 加入消化好的 pHDAd，小心地完全混合。
9. 逐滴加入 25μl 2.5mol/L 的 $CaCl_2$，边加边混合。

   这时溶液变浑浊但没有块状物质出现。
10. 在室温下孵育 30min。
11. 将 0.5ml 的 pHDAd 溶液一滴滴加入到 116 单层细胞中，但不要去除培养基。
12. 摇动培养皿，使沉淀物均匀分布，孵育过夜。
13. 第二天，去除培养基。
14. 用含有 10％FBS 的 1ml 的 MEM 洗两次。
15. 立即用 AdNG163 转染细胞，同时加入 5pfu/个细胞和 PBS，使体积达到 0.1ml。
16. 培育 1h，每隔 10min 摇动一下培养皿。
17. 加入 2.5ml MEM 和 5％的 FBS。
18. 48h 后，检测细胞的所有病理效应（CPE）。90％的细胞应该变成圆的，脱离培养皿。如果不是这样，看这一章末的问题解决方法。
19. 将细胞刮到培养基中，再放到一个小瓶子里面。加入 0.1 体积的 40％蔗糖溶液，储存在－80℃。取出 0.5ml 的细胞悬浮液来提取 DNA，检测载体扩增情况（参照步骤 26）。

## HDAd 扩增

20. 在 37℃解冻细胞悬浮液，在 37℃下达到平衡。混合溶解。

21. 在多种转染浓度 2pfu/个细胞和 0.4ml 转染细胞悬浮液中，辅助病毒和 HDAd 共同转染 90%的 60mm 培养皿 116 细胞系溶液。
22. 在保温箱中反应 1h，每隔 10min 摇动一次。
23. 在转染 1h 后，加入包含 5% FBS 的 2.5ml MEM 到单层细胞中。
24. 重复步骤 18～23，直到 HDAd 滴度达到最大。循环次数可能会变化。

## HDAd 扩增检测

我们一般并行扩增能够容纳 *lacZ* 表达盒的 HDAd（如 HD△28E4LacZ；图 3B），因为此载体的滴度在 293 细胞系中能够非常容易快速地通过 X-gal 染色来检测（Ng et al. 2002a）。在每个过程中，对照 HDAd 的滴度会上升 10～100 倍，一直到产生最大滴度，且被检测到这一过程像预期的那样（图 3C）。对于大部分没有报道基因 *lacZ* 的载体的扩增检测，是通过提取每一步中共转染的细胞总 DNA，用琼脂糖凝胶电泳、溴化二氨乙苯啡啶染色来检测的（图 3D）。

25. 在 293 细胞系的滴度上，用 X-gal 染色测定含有 *lacZ* 的载体的滴度（Ng et al. 2002a）。

    在每个过程中，对照 HDAd 的滴度会上升 10～100 倍，一直到产生最大滴度，且被检测到的这一过程像预期的那样（图 3C）。

26. 得到感兴趣的 HDAd 载体扩增。
    a. 在小离心机中离心细胞悬浮液（在步骤 19 中得到的），750*g* 离心 1min，去掉上清液。
    b. 重新在链霉蛋白酶-SDS 溶液中悬浮细胞颗粒，37℃下过夜培育。
    c. 加入 0.5ml 的 95%乙醇。让管子倒立，混合溶液，直到看到沉淀物形成。
    d. 用最大速度在小离心机中离心 1min，使 DNA 形成小球。
    e. 用乙醇清洗 DNA 两次，干燥。
    f. 在适当容积 TE 下重新悬浮 DNA。
    g. 在 65℃下加入 DNA，搅动，直到溶解。
    h. 消化样量，用适当的限制酶酶切。
    i. 用琼脂糖凝胶电泳和溴化二氨乙苯啡啶染色来检测。

    如果 HV-和 HDAd-特异条带能够明显的区分，说明 HDAd 的滴度达到最大（图 3D）。注意，HV-specific 带是我们希望看到的，而不是污染，因为 HV 基因组不包含包装信号；可以通过 Southern 印迹来检测（图 3D）。如果在几个步骤里面都看到这种现象，就取第一个出现这种现象的结果，因为载体或者辅助病毒的重排的概率随着步骤的增多会升高。如果得不到上述结果，就不断重复。

27. 在多种转染浓度 2pfu/个细胞和含有最大 HDAd 滴度的 0.5ml 菌液中，辅助病毒和 HDAd 共同转染 90%的 60mm 培养皿 116 细胞系溶液。
28. 在转染 48h 后，检测细胞，看是否有完全的各种细胞病理效应，将细胞刮到培养基中。
29. 750*g* 离心细胞悬浮液 5min。去除上清液。
30. 重新将细胞团悬浮于 1ml 100mmol/L Tris-HCl（pH8.0）溶液和 10%甘油，冰冻

在－80℃。

## 大规模生产 HDAd

辅助病毒和高滴度的 HDAd 共转染 116 细胞，在悬浮液中共生长。

31. 按照下述方法准备 116 细胞系：
    a. 将含有 116 细胞的废培养基从 8 个汇合培养皿中转到一个 3L 的细瓶子里。
    b. 敲打培养皿，将 116 细胞分开。将细胞和剩余培养液分到 3L 细瓶子里面。
    c. 在 37℃下，加入 MEM 和 5％热灭活的 FBS、0.1mg/ml 潮霉素、100U/ml 青霉素/链霉素和 2mmol/L L-谷氨酸，使最终容积为 1L。拧紧所有的盖子。
    d. 在 37℃下，60r/min 磁性搅拌机上过夜培育。
    在细瓶子里，细胞生长不需要潮湿，充满 $CO_2$ 的环境。
    e. 第二天加入 0.5L，继续过夜培育。
    f. 第二天加入 0.5L，继续过夜培育。
    g. 第二天加入 1L，继续过夜培育。
    最终容积为 3L。细胞密度每天增加，这可以通过在加培养基之前数数来确定。
32. 按照下述方法数悬浮液中 116 细胞数：
    在共转染时，细胞浓度非常关键，因为这将决定加入的辅助病毒的量和 HDAd 的产量。
    a. 将 2ml 的细胞加入到 15ml 圆锥形管子里。
    b. 37℃下加入 2ml 2×柠檬酸盐。在最大设置下混合 10s。
    c. 在 37℃下，培养 5～10min。
    d. 在最大设置下混合 10s。
    e. 使用血球计测量，得到两个独立的细胞数。
    如果这两个细胞数相差很大，则重新测量。而且要保证没有大量的不能计数的细胞团。细胞密度应该为 $2\times10^5$～$4\times10^5$ 个/ml。
    f. 在 3L 培养基中取 0.1ml 细胞悬浮液到 24 孔培养皿的一个孔中，加入 1ml 新鲜培养基。
    这些样品作为没有转染的细胞健康状态的对照。这些样品在几个小时后，将回贴，重新形成单层细胞。
33. 大规模共转染 116 细胞系：
    a. 在室温下，750*g* 离心 5min，从 3L 培养基中收集细胞。保存 0.5L 废培养基。
    b. 用 100ml 废培养基重新悬浮细胞团，转到 250ml 细瓶子里面。
    c. 在转染量为 2pfu/ml 和 HDAd 溶解时（步骤 30）加入辅助病毒共转染细胞。在 37℃下，用 60r/min 培养 2h。
    d. 将共转染的细胞转移到 3L 的细长小瓶子里。加入 0.5L 的废液和 1.5L 的新鲜 MEM 及 5％的 FBS（总共 2L）。
    e. 将 0.1ml 的共转染细胞转到 24 孔板培养皿中的一个孔里面，加入 1ml 新鲜 MEM 和 5％FBS。
    这些细胞重新贴壁，但是 48h 后变圆，离壁。如果不是，参考后面的问题解决方法。

f. 在 37℃下，用 60r/min 培养 2h。

g. 室温下，用 750*g* 离心 5min，收集共转染细胞。

h. 重新将细胞悬浮在 15ml 的 100mmol/L Tris-HCl（pH8.0）溶液中。转到 50ml 锥形管子中，和 HDAd 一起纯化。

也可以用这种方法：重新将细胞悬浮在 15ml 的 100mmol/L Tris-HCl（pH8.0）溶液中，加入 10%甘油，储存在−80℃下，以备后用。

## HDAd 纯化

34. 加 2.0ml 5%的脱氧胆酸钠溶液到共转染细胞溶液。

混合液立即变浓，变成凝胶状。

35. 在室温下，搅拌培养 30min。

36. 加入 170μl 2mol/L 的 $MgCl_2$、150μl RNase A（10mg/ml）、150μl DNase I（10mg/ml）。在 37℃下，搅拌培养 1h。

混合液立即变浓，变成凝胶状。

37. 室温下，用台式离心机最大转速离心 10min。提取上清液，保存。

38. 准备 CsCl 梯度超净离心管（每种病毒两个管）。

a. 每管加 2ml 1.35g/ml 的 CsCl。

b. 用 3ml 的 1.25g/ml 的 CsCl 小心覆盖。

c. 小心用步骤 37 的上清覆盖在两个管的上端。

如果需要的话，可以用 100mmol/L 的 Tris-HCl（pH8.0）充满管子的剩余部分。

39. 在 4℃，用一个 SW40 转子在 151 000*g*（36 000r/min）超速离心 1h。

40. 用一个在 3cc 注射器上的 18 号针头精准地收集管底部的载体部分。

HDAd 在管子的最底端（图 4A，见彩版）。

41. 把载体转移进一个超净的 SW55 管中，用 1.35g/ml 的 CsCl 补充满管。

42. 在 4℃，用 SW55 转子以 115 000*g*（35 000r/min）离心一夜。

43. 用一个在 1cc 注射器上链接的 22 号针头精准的收集管底部的 CsCl 梯度载体部分。

44. 把载体转移进一个超净的 SW55 管中，用 1.35g/ml 的 CsCl 补充满管。

45. 在 4℃，用 SW55 转子以 115 000*g*（35 000r/min）离心一夜。

46. 用一个在 1cc 注射器上链接的 22 号针头精准地回收 CsCl 梯度载体部分。重复步骤 44 和 45。

包含 HDAd 的单一条带将出现，如果出现不止一条带，请看最后面的疑难解决。

47. 用一个在 1cc 注射器上链接的 22 号针头精准地收集管底部的 CsCl 梯度载体部分。按照制造商的简介，4℃条件下转移进一个透析缓冲液预浸渍的 Slide-A-LyZer 盒子。

48. 在 4℃条件下，用三个 500ml 的透析缓冲液透析一夜，慢慢搅拌除去 CsCl。

49. 用一个在 1cc 注射器上链接的 22 号针头回收盒子中的病毒。记下载体的体积并转移进一个玻璃瓶。加入甘油使最终浓度为 10%，并混合好。

移除载体制品最少两小部分，转移进离心管中提取 DNA，吸光度在 260nm。这些部分的体积依靠获得载体的数量，而不是典型的 10～15μl 体积。另外可以取出少部分以用于其他的

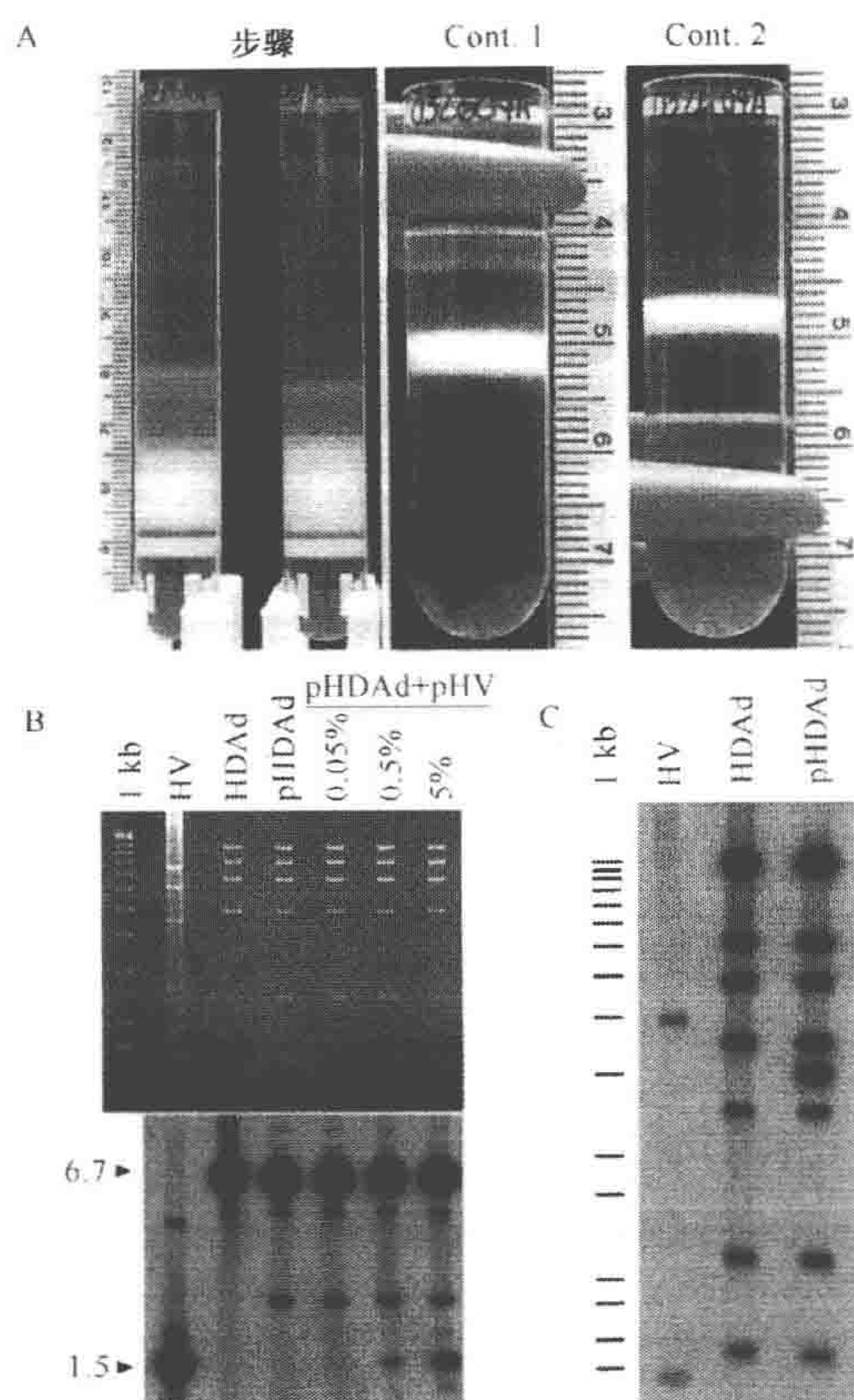



图 4. 使用 AdNG163 纯化和鉴定从 3L 的 116 细胞产生的 HDΔ28E4LacZ。A. 通过一个单一的步骤和两个连续的 CsCl 梯度（Cont. 1，Cont. 2）纯化 HDAd。在所有的 CsCl 梯度中仅仅能看见一个病毒带。CsCl 梯度中最低的带是病毒体。具有一个特殊的 29 126vp/细胞产率，在该样本中 HDAd 的产率是 $2.6\times10^{13}$；B. HDAd 辅助病毒的污染分析。从纯化的病毒体中提取 DNA 并用 *Apa*Ll 消化。(1kb) 1kb PLUS 标准（生命工艺学）；(HV) AdNG163 DNA；(HDAd) HDΔ28E4LacZ DNA；(PHDAd) 亲代 pΔ28E4LacZ 质粒 DNA。对照带（pHDAd＋pHV）：*Apa*L1 和 *Pac*I 消化的辅助病毒与 10 倍的一系列（0.05%～5%）*Apa*Ll 和 *Pac*I 消化的辅助病毒质粒 pNG163（pHV）混合。(最上面的带) 溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶；(较低的条) 与探针 ψ 杂交的 Southern 印迹。除了缺少 2.5kb *Apa*Ll-*Pme*I 片段支撑的细菌质粒序列外，HDAd 结构和 pHDAd 没什么区别。用探针 ψ 的 Southern 分析显示有 6.7kb 的 HDΔ28E4 LacZ 特殊条带，但是没有检测到 AdNG163 特别的 1.5kb 条带。在 pHDAd 带中 HDAd 中外在的条带也存在，因此对于其他的载体带来说代表没有特殊性的杂交探针，而不是产物的重新排列。根据和对照组的比较，准备的 HDAd 的辅助病毒的污染小于 0.05%；C. HDΔ28E4LacZ 基因的结构。从纯化的 HDAd 中提取 DNA，用 *Hpa*I 消化，使用 pΔ28E4LacZ 为探针进行 Southern 印迹分析。(1kb) 1kb PLUS 标准（生命工艺学）；(HV) AdNG163 DNA；(HDAd) HDΔ28E4LacZ DNA；(PHDAd) 亲代 pΔ28E4 LacZ 质粒 DNA。除了缺少 3.0kb *Pme*I 片段支撑的细菌质粒序列外，HDAd 基因的结构和 pHDAd 没什么区别。在 HV 中的条带代表和以 pΔ28E4LacZ 为探针的同源 ψ 和 ITR 序列杂交的末端片段。

鉴定。

50. 等分部分载体并储存在－80℃。

按照33步叙述的步骤，而不是在33c步中叙述的从150mm的板中用200vp/个细胞代替溶菌产物。使用纯化的HDAd代替粗溶菌产物可以极大地简化生产，改善黏稠性。

## 方案2

# HDAd检测

最后，纯化的载体需要被评估。检测的指标有物理滴度、辅助病毒的污染程度、HDAd基因组结构。根据需要，可以据E1-缺失的Ad载体的操作方法应用其他指标（如内毒素、无菌状态、外来物质等）来评测。

## 方法

### 物理滴度

1. 为评估载体的物理滴度要做的前期准备有：物理滴度是指病毒颗粒在制备的载体中的浓度，它根据病毒颗粒溶解后在260nm出的吸收峰来测量（Maizel et al. 1968），再据载体基因组大小矫正（Ng et al. 2002a）。这个方法的最终目的是检测病毒DNA在载体中的多少，并用vp/ml表示。

   a. 将病毒颗粒缓冲液加入到纯化载体样品中（步骤49），使容积达到0.5ml。

      同时做一个空白对照，即把病毒颗粒缓冲液加到载体赋形剂［10mmol/L Tris-HCl（pH8.0）和10%的甘油］中，使容积也达到0.5ml。

   b. 简单地混合两种样品，注意不要冒泡。

   c. 在56℃培育样品10mol/L。

   d. 再混合样品1mol/L。

   e. 使用空白对照作为260nm和280nm处的参考数据。接着检测载体样品在260nm和280nm处的吸收峰。

      260/280的比值，是相对纯度，应该在1.3左右。

   f. 利用下面的公式计算在260nm处的吸收峰vp/ml：

      vp/ml＝(260nm处的吸收峰)（稀释系数）($1.1\times10^{12}$)（36)/(载体大小，单位kb)

### 辅助病毒污染

HDAd总是被辅助病毒污染，而且精确地测量污染水平很关键。

2. 用Southern杂交方法分析辅助病毒污染（图4B）。

   也可以用实时定量PCR分析（Palmer and Ng 2003），但是用菌斑分析很不稳定（Palmer and Ng 2005）。

### HDAd基因组结构

3. 检测载体基因组结构。

   a. 提取DNA，将一个纯化的载体样品用适当的限制酶消化。

b. 用琼脂糖凝胶电泳和溴化二氨乙苯啡啶染色来确定 HDAd 的基因组结构。Southern 杂交的方法更灵敏（图 4B，图 4C）。

### 载体感染率

除了物理滴度（vp/ml），HDAd 还有一个感染量。感染量的定义为病毒颗粒实际转导的细胞比例。其单位是转染单位的数目（IU）/ml。病毒颗粒与感染量的比（vp∶IU）就是载体转染量，代表了具有感染性的病毒颗粒总量的感染比例。通过定义可以看出，vp∶IU 越大，转染量就越低。这是一个比较不同载体（或者同一载体含有不同物质）转染效率的重要指标。因为如果转染量不同就会得出错误结论。而且，病毒颗粒本身可能调节剂量依赖性急性毒性（Brunetti et al. 2004，2005；Muruve et al. 2004），非感染性颗粒（可以通过高 vp∶IU 比例来体现）可能会提高风险而降低效率。考虑到这种情况，食品药物管理局建议临床用的具有转染性的 Ad 载体浓度应该小于 30∶1（Simek et al. 2002）。因为 HDAd 自身不能繁殖，因此根据细胞病变效应使用的早期的 Ad 载体不能应用，而且没有报道转基因（如 *lacZ*）的 HDAd 的转染量很难测定。但是，最近有人设计了一种可以测量 HDAd 转染量的方法（Palmer and Ng 2004）。

### 处理和存储

如果处理和保存的方法正确，腺病毒包括 HADd 是相对稳定的。载体应该保存在 −70～−80℃。纯化后（在第一次冷冻之前），通过制备很多份载体制剂试样量，使冻融剂的用量最少化。当使用的时候，载体应该在室温下解冻，然后以最快的速度转到 −70～−80℃温度下。正确的处理和存储对保持载体的转染量很重要。如果用干冰冷冻载体，将会降低载体的转染量。因为载体溶液的 pH 会受到 $CO_2$ 的影响（Nyberg-Hoffman and Aguilar-Cordova 1999）。因此，如果要用干冰运输载体，需要格外谨慎。同样，HV 和所有的基于 Ad 的载体都是这样。

## 疑难解答

问题：在制备 HDAd 或者大规模生产 HDAd 时，48h 后，没有观察到 116 细胞的所有细胞病毒性效应。

解决方法：HV 的用量不够，增加 HV 的用量。

问题：在一系列扩增样品的琼脂糖凝胶电泳上看不到辅助病毒或者特定的 HDAd 条带。

解决方法：一直扩增（步骤 21～25）直到看到这两条带。

问题：在 CsCl 梯度上看到不止一条带。

解决方法：小心地提取每个带，通过 DNA 分析来确定它们直接的相似性。有两个主要的影响因素：辅助病毒污染（见下面）；载体基因组重排。如果 HDAd 的基因组大小大于最佳的包装大小（Bett et al. 1993；Parks and Graham 1997）或者 HDAd 基因组有重复序列或不稳定元素，就会发生重组。调整最开始的 pHDAd 来解决这些问题。

问题：HV 污染程度很高。

解决方法：HDAd 总是被 HV 污染。如果 HV 污染很高，HDAd 和 HV 基因组大小足够不同，在超速离心后，连续的 CsCl 浓度梯度会出现两条非常清晰的带。因此，HDAd 基因组大小最好比 HV 基因组小。这样，HDAd 是上面的带，HV 是下面的带。去掉下面的 HV 带，收集上面的 HDAd 带。HV 污染最主要的原因是 HV 包装信号的不完全切除，这是因为 Cre 在生产细胞系的低水平表达（Ng et al. 2002a；Palmer and Ng 2003）。一个解决方法是，使用 Cre 表达量高的生产细胞系。其他造成 HV 污染的因素有 HV 的突变/重排，这阻碍了包装信号的切割，但是这种情况很少发生（Ng et al. 2002a）。确保每一个 HV 原料来自于一个非常孤立的菌斑。而且，牢记污染事件随着扩增发生的概率会越来越大。

## 致谢

P. N. 由国家卫生研究所（P50 HL59314、R01 DK067324 和 P51 RR13986），得克萨斯州附属机构美国心脏协会（0465102Y），囊肿性纤维化基金（NG0530 和 NG05G0）。

## 参 考 文 献

Bett A.J., Prevec L., and Graham F.L. 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67:** 5911–5921.

Brunetti-Pierri N., Palmer D.J., Beaudet A.L., Carey D., Finegold M., and Ng P. 2004. Acute toxicity following high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into non human primates. *Hum. Gene Ther.* **15:** 35–46.

Brunetti-Pierri N., Palmer D.J., Mane V., Finegold M., Beaudet A.L., and Ng P. 2005. Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol. Ther.* **12:** 99–106.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., and Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36:** 59–74.

Kochanek S. 1999. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10:** 2451–2459.

Maizel J.V., White D., and Scharff M.D. 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence of multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7a, and 12. *Virology* **36:** 115–125.

Muruve D.A., Cotter M.J., Zaiss A.K., White L.R., Liu Q., Chan T., Clark S.A., Ross P.J., Meulenbroek R.A., Maelandsmo G.M., and Parks R.J. 2004. Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J. Virol.* **78:** 5966–5972.

Ng P. and Graham F.L. 2002. Construction of first generation adenoviral vectors. *Meth. Mol. Med.* **69:** 389–414.

———. 2004. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. In *Gene therapy: Therapeutic mechanisms and strategies*, 2nd edition (ed. N.S. Templeton), pp. 53–70. Marcel Dekker, New York.

Ng P., Parks R.J., and Graham F.L. 2002a. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Meth. Mol. Med.* **69:** 371–388.

Ng P., Evelegh C., Cummings D., and Graham F.L. 2002b. Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the *Cre/loxP* helper-dependent adenoviral vector system. *J. Virol.* **76:** 4181–4189.

Ng P., Beauchamp C., Evelegh C., Parks R., and Graham F.L. 2001. Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Mol. Ther.* **3:** 809–815.

Nyberg-Hoffman C. and Aguilar-Cordova E. 1999. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat. Med.* **5:** 955–957.

Palmer D.J. and Ng P. 2003. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol. Ther.* **8:** 846–852.

———. 2004. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: A method of direct comparison to the adenovirus reference material. *Mol. Ther.* **10:** 792–798.

———. 2005. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **16:** 1–16.

Parks R.J. 2000. Improvements in adenoviral vector technology: Overcoming barriers for gene therapy. *Clin. Genet.* **58:** 1–11.

Parks R.J. and Amalfitano A. 2002. Separating fact from fiction: Assessing the potential of modified adenovirus vector for use in human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2:** 111–133.

Parks R.J. and Graham F.L. 1997. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J. Virol.* **71:** 3293–3298.

Parks R.J., Bramson J.L., Wan Y., Addison C.L., and Graham F.L. 1999. Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors. *J. Virol.* **73:** 8027–8034.

Parks R.J., Chen L., Anton M., Sankar U., Rudnicki M.A., and Graham F.L. 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 13565–13570.

Simek S., Byrnes A., and Bauer S. 2002. FDA perspective on the use of the adenovirus reference material. *BioProcessing* **1:** 40–42.

Toietta G., Pastore L., Cerullo V., Finegold M., Beaudet A.L., and Lee B. 2002. Generation of helper-dependent adenoviral vectors by homologous recombination. *Mol. Ther.* **5:** 204–210.

# 第十七章　细胞和组织靶向

Yosuke Kawakami[*] 和 David T. Curiel[*†]
[*] Division of Human Gene Therapy, Departments of Medicine, Surgery, Pathology and
[†] Gene Therapy Center, University of Alabama, Birmingham, Alabama, 35294
古同军和许严伟　译



## 摘要

治疗药物对细胞具有靶向毒性和非靶向毒性的效果的比率决定了这个药物的药效。基因转移治疗方法的重要目标之一，是针对靶细胞得到最大的转染率和最大的转基因表达量。然而，相关的实验研究证明，现有的基因输送系统不能很好地、有选择性地将目的基因输送到靶细胞。另外，由于载体自身缺少特异性靶向，导致在非靶细胞中的转导而产生非预期的毒性，即使采用较小剂量的载体也会产生非靶向毒性。因此，对载体进行最适化改造变得非常重要。当前，腺病毒（Ad）感染细胞的生命周期和生物学特征已经被研究得很清楚。在 Ad 病毒感染和转基因的表达中，存在三个必需的连续步骤：①病毒结合到细胞表面受体上；②内化过程；③病毒基因组转移到细胞核。本章的实验方法介绍了 Ad 病毒的构建方案，即如何利用这些病毒通过一级或二级 Ad 受体靶向、结合并进入靶细胞（转导过程），以及这些病毒携带的外源基因在靶细胞内的表达（转录和翻译）。

## 引言

腺病毒血清型 5（Ad5）是基因治疗里最常用的病毒载体，因为它可以转导广泛的细胞类型，包括分裂的细胞和不分裂的细胞。有关 Ad5 感染细胞的生物学、基因组、衣壳蛋白的功能和复制周期都已研究得很清楚（Varga et al. 1991）。图 1 简要显示了 Ad5 感染和基因表达所必需的三个连续步骤。根据这些步骤，有两个有关靶向的环节值得讨论：①通过一级或二级 Ad 受体，Ad 结合并进入靶细胞；②通过转录和翻译在靶细胞内表达转基因的蛋白质。

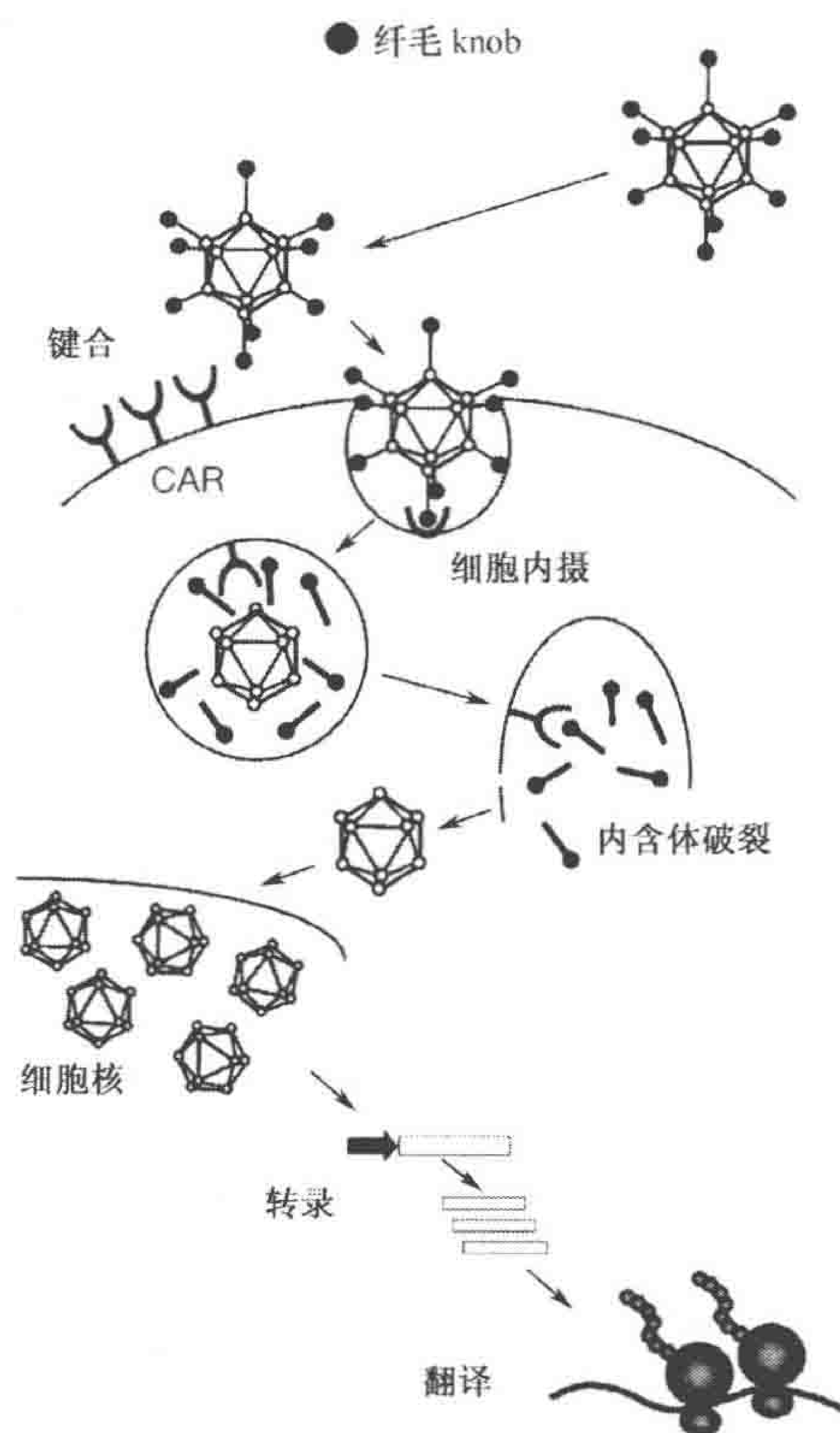


图 1. Ad 进入细胞通路和 Ad 载体的靶向重塑。Ad 通过其纤毛蛋白球，与靶细胞表面受体（CAR）结合，病毒被内吞，在内含体中解体，基因组进入细胞核，通过转录和翻译表达转基因。靶向重塑可以在两个过程进行，即在病毒-细胞结合期（通过直接或间接改造纤毛蛋白的特异性）以及转录期（通过插入细胞/组织特异性的启动子）。

Ad5 通过其纤毛蛋白 C 端区域的球形蛋白与靶细胞上的 Ad5 受体——CAR 受体（柯萨奇病毒-腺病毒受体）相识别，触发对靶细胞的感染（Bergelson et al. 1997）。然而，由于许多肿瘤的 CAR 受体是极小量的，对 Ad5 的感染并不敏感（Freeman and Zwiebel 1993；Culver and Blaese 1994；Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf 1994；Herrmann 1995）。另外，Ad5 却能导致许多非靶向组织的转导。这阻碍了 Ad5 在体内的靶向，并激发了免疫反应，使重复给药变得困难。同时，这也缩短了治疗基因表达的周期。

通过从遗传学上对 Ad5 进行改造，即删除原有的广谱的靶向性，导入针对单一细胞类型的靶向特征，使之获得只针对这类细胞的特异性转导，这样的思路我们称之为病毒载体的“靶向重塑”。这个方法的优点是，重塑靶向的 Ad5 载体不仅获得了更高的转导特异性，还获得了更高的转基因活性，从而克服了在多数的转录靶向的实验中转基因活性受到抑制的缺点。Ad5 的靶向重塑有两种方法，这两种方法都是获得不依赖 CAR 受体的转导能力（Goldman et al. 1997；Wickham et al. 1997）：其一，直接对载体本身进行遗传学改造；其二，使用靶向接头分子。

直接对 Ad5 进行遗传学改造的方法包括如下几种：遗传学改造衣壳蛋白，对纤毛 knob 蛋白进行修饰，或者是构建一个嵌合的纤毛，即在 Ad5 纤毛的尾和体部融入一个外源球形的结构域（Stevenson et al. 1995，1997；Krasnykh et al. 1996）。这些整合的

结构域能指导病毒以非依赖 CAR 的方式进入靶细胞。例如，在纤毛蛋白球的 C 端插入一段 Arg-Gly-Asp（RGD）或者是多聚赖氨酸片段，构建重塑 Ad 载体，分别能与靶细胞的 $\alpha_v$ 整联蛋白或硫酸乙酰肝素受体结合（Wickham et al. 1993，1997；Dmitriev et al. 1998），从而转到靶细胞。这种载体对缺少 Ad 初级受体的靶细胞来说，提高了 5～500 倍的转导效率，这样的靶细胞包括：巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和 T 细胞（Davidoff et al. 1999；Von Seggern et al. 2000；Haviv et al. 2002；Kanerva et al. 2002；Kawakami et al. 2003；Volk et al. 2003）。

另一种转导靶向重塑的方法就是使用双重接头蛋白（Dmitriev et al. 2000；Haisma et al. 2000；Hemminki et al. 2001；de Gruijl et al. 2002；Kashentseva et al. 2002；Hakkarainen et al. 2003；Breidenbach et al. 2004；Korn et al. 2004；Nettelbeck et al. 20041；Pereboev et al. 2004 ）。双特异性接头蛋白的功能之一是能与 Ad 纤毛上的球形蛋白结合，阻止它与 CAR 受体结合。能达到这一功能的成分有：抗-Ad 球形蛋白的 Fab 片段、单链 Fv（scFv）片段、CAR 的胞外片段。双特异性接头蛋白的另一成分能引入针对靶细胞的特异性，此成分通过化学或遗传学的方法连接到球形结合部分。这样的分子中一些是与靶细胞上特异受体相结合的抗体（Fab、scFv）或配体（Douglas et al. 1999）。重组融合蛋白质技术为更简便的构建和纯化这样的分子提供了技术基础。

细胞和组织靶向的目标是在转导细胞致死基因或药原激活的酶时，应尽量减少转导基因的异位表达，以降低毒性。事实上，报道指出通过 Ad 转移基因后，转基因在非靶细胞内的表达而导致的毒副效应，尤其表现为肝脏毒性和骨髓毒性（Huard et al. 1995；Reynolds et al. 1999；Varnavski et al. 2005）。此外，如果转基因在免疫细胞异位表达，会导致针对转基因的免疫反应，这更限制了基因治疗的效果（Huard et al. 1995；van der Eb et al. 1998；Reynolds et al. 1999；Bilbao et al. 2000；Kirn et al. 2001）。有效的基因治疗方案必须能控制转基因在靶细胞的表达，而在非靶细胞不表达。这种目的基因在靶细胞特异表达的要求，能够通过组织特异性启动子（TSP）——一种能在特定细胞类型控制基因表达的 DNA 片段，来控制实现（图 2）。当然这种转录靶向重塑的方法有一个主要缺点，就是靶组织或器官的病理改变如退化或恶性转化会导致异位激活 TSP。

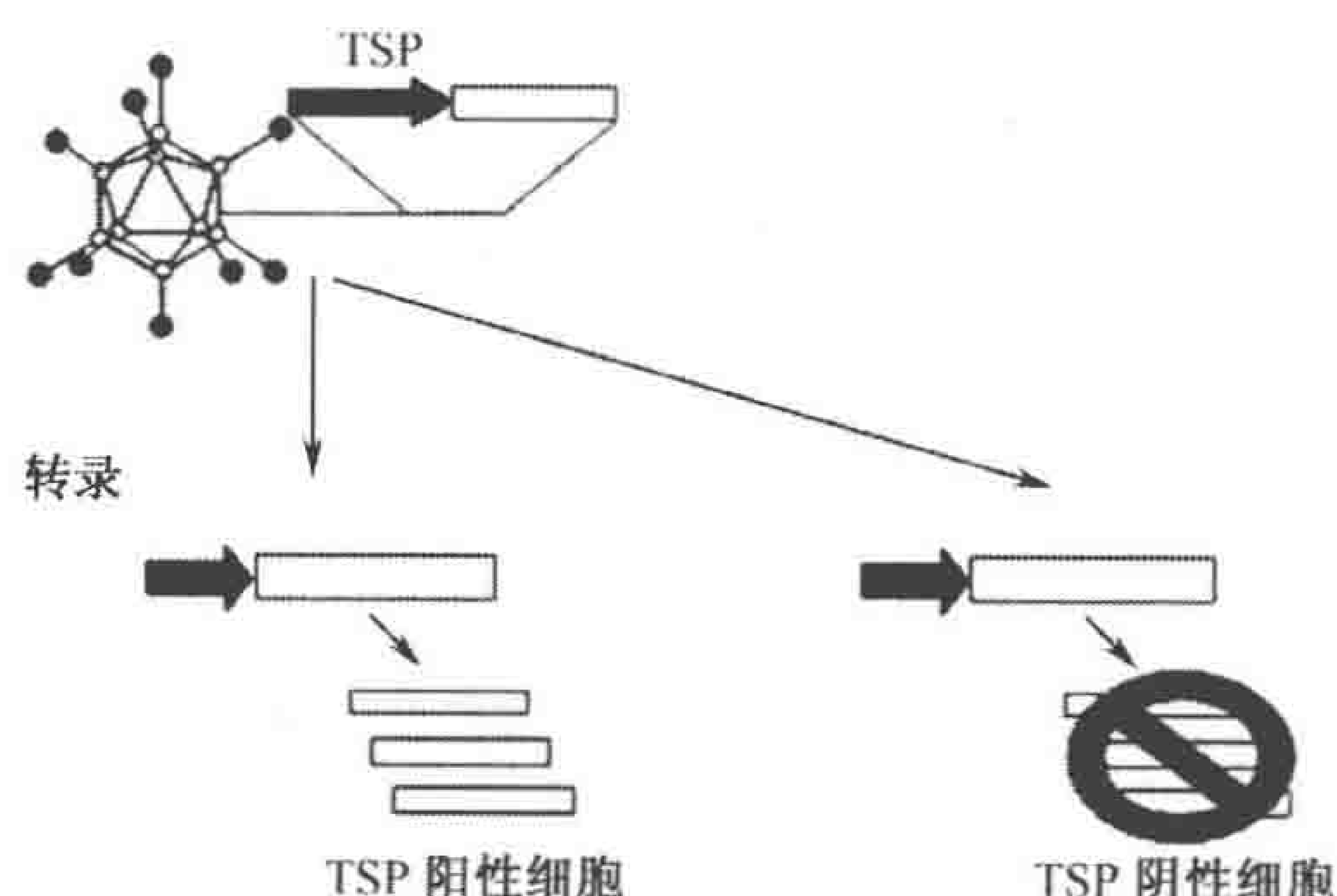



图 2. 转录靶向的图示。有效的基因治疗策略必须在靶细胞中表达转基因（TSP 阳性），从而导致其处于“开启”的状态；在非靶细胞不表达转基因（TSP 阴性），使其处于“关闭”的状态。

## 方案1

# 为转导靶向构建RGD-修饰纤毛的Ad载体

通过载体pAdEasy-1和纤毛穿梭载体（pFiber-dE3-RGD）的同源重组构建一个纤毛突变质粒。这个合成的纤毛修饰质粒载体（pAdEasy-RGD）与AdEasy-1的基因组相同（除纤毛区域外）。并且，这个载体能进行第二轮的同源重组，与pShutter-promoter-luc重组构建一个能同时表达萤光素酶和RGD-修饰纤毛球形蛋白的Ad载体。（使用Ad-Easy系统进行Ad载体同源重组、扩增以及纯化的详细方法参考第十五章Ross和Parks的方法）

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

AdEasy系统（Qbiogene）

这一系统包括pAdEasy-1（去除E1/E3的质粒）和pShuttle（一个转基因-启动子表达框）。

琼脂糖

硫酸铵（预冷）<!>

菌株：BJ5183和DH5α

卡那霉素（25μg/ml）<!>

LB培养基

质粒：pABS.4（Microbix）

PCR引物

primer A（5′-AAG CTA GCC CTG CAA ACA TCA-3′）

primer B（5′-GCA GAA GCA GTC TCC TCG GCA GTC GCA ACT TGT GTC TCC TGT TTC CTG-3′）

primer C（5′-TGC GAC TGC CGA GGA GAC TGC TTC TGC CCA AGT GCA TAC TCT ATG TCA TTT-3′）

primer D（5′-TGC AAT TGA AAA ATA AAC ACG TTG AAA-3′）

限制性内切核酸酶：*Eco*RI、*Bst*BI、*Bam*HI、*Mfe*I、*Nhe*I、*Pac*I、*Swa*I

此外，用于同Ad载体源重组、扩增、纯化的其他试剂参看第十五章Ross和Parks的方法。

### 仪器

PCR仪

此外，用于同Ad载体源重组、扩增、纯化的其他仪器参看第十五章Ross和Parks的方法。

## 方法

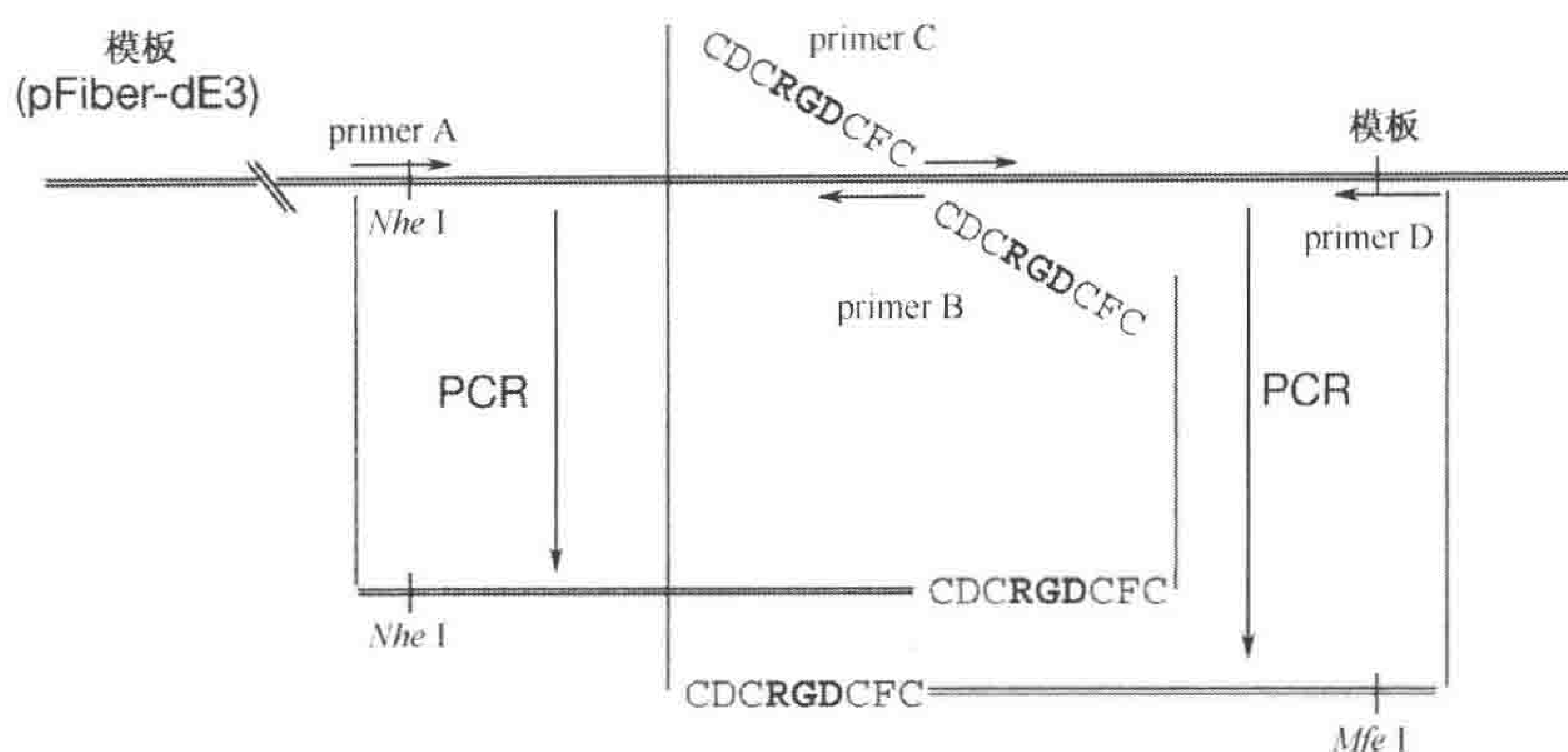
### 为纤毛修饰构建穿梭质粒载体

1. 从回收质粒分离抗-氨苄青霉素的纤毛区域片段。
   a. *Eco*RI 酶切 10μg 抗-氨苄青霉素的 pAdEasy-1 质粒 4h。
   b. 1%琼脂糖胶回收 9.6kb DNA 片段。
   c. 连接环化。
   合成的新质粒（pFiber-dE3-Amp）具备完整的纤毛区域。
2. 分离抗-卡那霉素抗性基因。
   a. *Eco*RI 酶切 10μg pABS.4。
   b. 用 Klenow 片段补齐酶切末端。
   c. 用连接酶环化重组的质粒（pABS.4ΔEcoRI)。
   d. 用 *Eco*RI 酶切 pABS.4ΔEcoRI。
   e. 用 Klenow 片段补齐 *Bam*HI 位点。
   f. 用 *Bst*BI 酶切 pABS.4ΔEcoRI。
   合成的 1.3kb 片段包含卡那抗性基因和末端两个 *Swa*I 位点。
3. 将卡那抗性基因插入抗-氨苄纤毛载体。
   a. 用 *Mfe*I 酶切 pFiber-dE3-Amp。
   b. 用 Klenow 片段补齐 *Mfe*I 位点。
   c. 用 *Bst*BI 酶切 pFiber-dE3-Amp。
   d. 将 1.3kb 的 *Bst*BI 平末端的片段插入 pFiber-dE3-Amp 的 *Mfe*I-*Bst*BI 位点。
   合成的载体（pFiber-dE3）包括纤毛区域和氨苄抗性基因与卡那抗性基因。

### 构建突变的纤毛 knob 基因（图 3）

4. PCR 制备互补的 RGD-4C 片段。
   a. 加入 30μmol/L 的 primer A（上游引物）和 primer B（下游引物）到 500ng 的 pFiber-dE3 中，制备 *Nhe*I-(RGD-4C)。
   b. 加入 30μmol/L 的 primer C（上游引物）和 primer D（下游引物）到 500ng 的 pFiber-dE3 中，制备（RGD-4C)-*Mfe*I 片段。
   c. 按如下条件设置 PCR：94℃变性 10min，35 个循环（94℃，30s，50℃，30s，72℃，60s)，72℃，10min。
   d. 用 2% 的琼脂糖胶回收 *Nhe*I-(RGD-4C)（1199bp）和（RGD-4C)-*Mfe*I (180bp)。
5. 制备突变的纤毛 knob 序列。
   a. 混合 *Nhe*I-(RGD-4C) 和 (RGD-4C)-*Mfe*I 两个片段。
   b. 不再加入引物 PCR 扩增 500ng 的混合物，条件如下：94℃变性 4min 30s，10 个循环（94℃，60s，52℃，60s，72℃，4min)，72℃，6min。
   c. 用 1%的琼脂糖胶回收 PCR 产物（1352bp)。

第一步




第二步

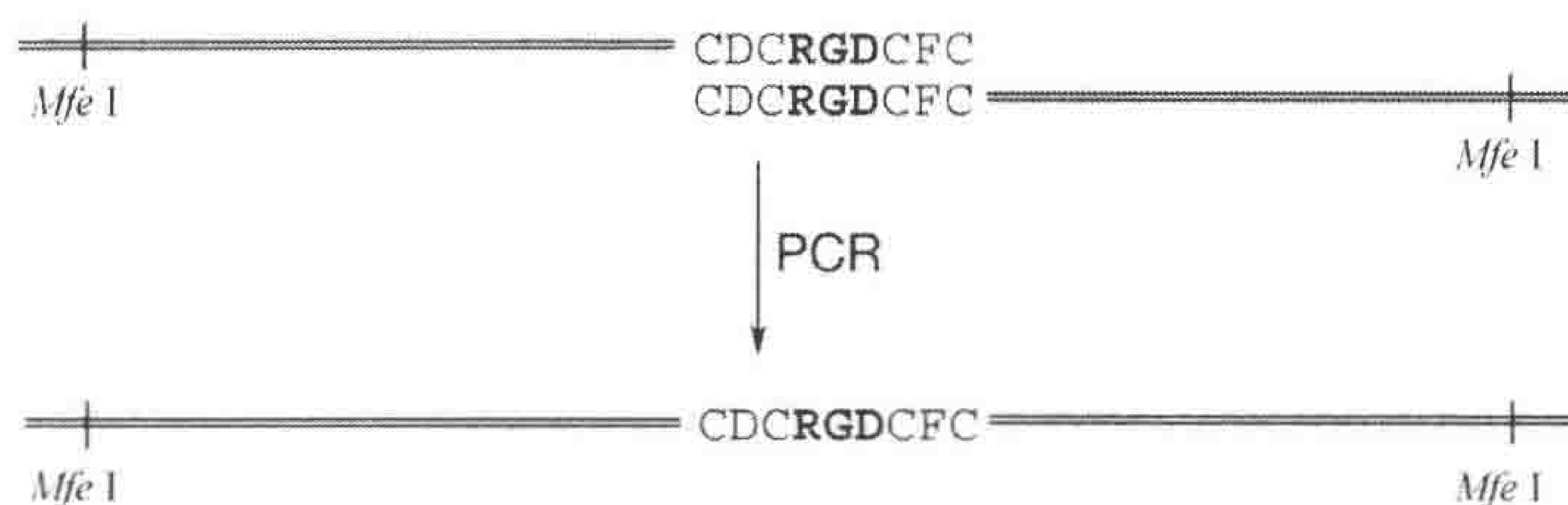



图 3. RGD-4C 插入 Ad5 节 H1 环的策略。在第一次 PCR 循环中，从 PFiber-dE3 质粒的 *NheI* 和 *MfeI* 位点产生完全的 RGD-4C 片段。这些片段被混合，在 PCR 次级循环中产生一个单一的 *NheI*-*MfeI* 片段，包括突变的纤维节。该片段能被克隆进一个适合的穿梭质粒。

6. 在穿梭质粒载体中插入纤毛 knob 的序列。
   a. 用 *NheI* 和 *MfeI* 酶切 10μg PCR 产物 4h。
   b. 1%琼脂糖胶回收片段。
   c. 将 *NheI* 和 *MfeI* 酶切的 PCR 产物插入 pFiber-dE3 质粒的 *NheI*-*MfeI*。

   合成的纤毛穿梭质粒载体（pFiber-dE3-RGD）具备 RGD-修饰的突变纤毛和对氨苄和卡那的抗性。

## 构建纤毛修饰的回收质粒

7. 将 10μg pFiber-dE3-RGD 先用 *EcoRI* 酶切 4h，再用 *PacI* 酶切 4h。
8. 用 1%的琼脂糖胶回收 7.2kb 的 DNA 片段。

   这一片段包括整个的纤毛区域和卡那抗性基因。
9. 以 10∶1 比例混合 7.2kb 片段和未酶切的 pAdEasy-1。
10. 用混合的质粒混合物转化菌株 BJ5183，在含 25μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基中 30℃培养过夜。
11. 对单克隆小提质粒，分析和鉴定 pAdEasy-RGD-A/K 质粒的存在和大小（35kb），它应该具备卡那抗性基因和氨苄抗性基因。

12. 将质粒 pAdEasy-RGD-A/K 转化 DH5α 并大量扩增。

### 构建纤毛修饰的 Ad 载体

13. 将 3μg 的 pAdEasy-RGD-A/K 用 *Swa*I 酶切 4h，并用 2%琼脂糖胶分离。

    这个过程去除 1.3kb 的卡那抗性片段。

14. 回收 35kb Ad 的骨架片段。
15. 连接环化。

    这个合成的纤毛-修饰的质粒 pAdEasy-RGD 去除了 E1/E3 区域，而在 knob 的 HI 环区域插入了 RGD-4C 片段。

16. 使用 pShuttle-CMV-Luc（穿梭质粒）和 pAdEasy-RGD（纤毛-修饰的 Ad 骨架质粒）以同源重组的方法制备和纯化 Ad 载体。

    构成性的 CMV 启动子只在转导靶向的样品中使用。实验检测得，不论转导靶向还是转录靶向，CMV 都可以由 TSP 取代（见方案 3 步骤 1）。

17. 检测合成的 Ad 载体对表达 αv 整联蛋白表面受体的细胞的靶向转染效率。

**方案 2**

## 为转导靶向构建融合蛋白

构建一个重组融合蛋白，去除了 Ad 载体原有的与 CAR 受体的靶向性，使得这个载体对表达 EGF 的细胞具有特异的靶向（EGF；图 4）。

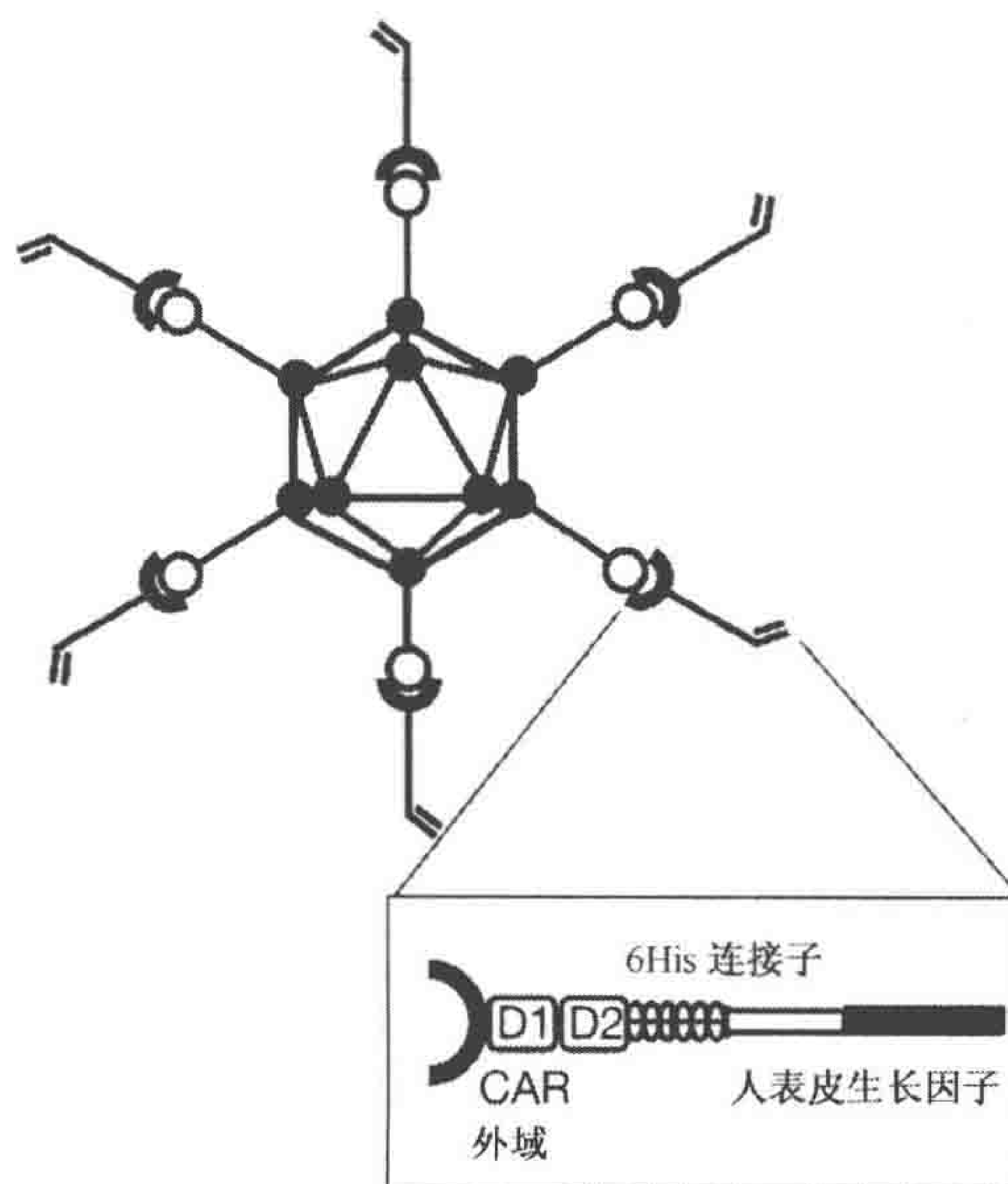



图 4. CAR 外功能区和 hEGF 融合蛋白的靶向作用。融合蛋白的氨基端由任 CAD 的细胞外部分通过先导的 6His 纯化标签和一个短肽链（PSASASASAPGS）与人的 EGF（hEGF）相连。CAR 区域可与 Ad5 纤维球节结合，而 hEGF 区域可与细胞上的 EGFR 结合，从而促进腺病毒附着于表达 EGFR 的细胞。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖
硫酸铵（预冷）<!>
细胞株：293 细胞
G418（500μg/ml）<!>
磷酸盐缓冲液（PBS）
质粒

pBsF5slEGF
pcDNA3.1（Invitrogen）
pQBI-AdCMV5（Qbiogene）

PCR 引物

primer E（5′-AAA CCG CCT ACC TGC AGC CG-3′）
primer F（5′-GAG CTT TAT TTG AAG GAG GGA CAA CG-3′）
primer G（5′-GAT CCC CCC GAT ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAT AAA-3′）
primer H（5′-GGC CTT TAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TAT CGG GGG-3′）
primer I（5′-CCC ATT GGC CAT CAG CCT CCG CAT C-3′）
primer J（5′-GCC CCC GCT CGA GGT CGA CGG TAT C-3′）

限制性内切核酸酶：*Eco*RV、*Bam*HI、*Msc*I、*Not*I、*Pme*I、*Pvu*I、*Sal*I、*Xho*I

### 仪器

PCR 仪
TALON 亲合层析树脂，固定有金属钴
Western blot 杂交用的材料和试剂

此外，用于同 Ad 载体源重组、扩增、纯化的其他仪器参看第十五章 Ross 和 Parks 的方法。

## 方法

### 制备 shCAR-6His 片段

1. 制备 6His 标签。
   a. 合成寡聚核苷酸：5′-GAT CCC CCC GAT ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAT AAA-3′ 和 5′-GAT CTT TAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TAT

CGG GGG-3′。

这形成一段 DNA 双链，编码 His 标签，含有两个通用终止子、*Bam*HI 和 *Eco*RI 位点，用于融合 CAR 的可读框和 6His 的编码序列。

b. 用 *Bam*HI 酶切 pQBI-AdCMV5。

c. 将上述的寡聚核苷酸插入 pQBI-AdCMV5 的 *Bam*HI 位点。

d. 对合成的质粒 pQBI-AdCMV5.6h 的插入区域进行测序。

在 6His 序列的上游有一个 *Pme*I 位点。

2. 将纯化的 6His 标签导入 CAR 的 C 端。

a. 用 *Pme*I 和 *Eco*RV 酶切 pQBI-AdCMV5.6h。

b. 用上述 primer E 和 primer F PCR 扩增人 CAR 的胞外区域（20～767）。

c. 将 PCR 产物克隆进 *Pme*I/*Eco*RV。

这个质粒 pQBIshCAR.6h 编码 CAR 的胞外区域的 236 个氨基酸，包括信号序列、融合的 C 端的 6His 标签。

3. 将 CAR-6His 序列插入 pcDNA3.1 质粒。

a. 用 primer G 和 primer H 以 pQBIshCAR.6h 为模板 PCR 扩增编码 shCAR-6His 的 DNA 片段。

PCR 产物具有独特的 5′*Bam*HI 位点和 3′*Not*I 位点，有利于下面的克隆操作。

b. 用 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切 PCR 产物和 pcDNA3.1。

c. 将 PCR 酶切产物克隆入 pcDNA3.1 的 *Bam*HI 和 *Not*I 位点。

这个质粒 pcDNAshCAR.6h 编码 CAR 的 N 端的胞外区域，包括信号序列和融合的纯化的 6His 标签。

## 短接头和人 EGF 片段的制备

4. 用 primer I 和 primer J 从质粒 pBsF5slEGF 中 PCR 扩增短接头和 hEGF 的 DNA 片段。

PCR 产物的 DNA 片段具有独特的 5′*Msc*I 和 3′*Sal*I 位点，以便于之后的克隆。

5. 用 *Msc*I 和 *Sal*I 酶切 PCR 产物。

6. 琼脂糖回收 282bp 的 DNA 片段。

## 制备重组的 CAR/hEGF 融合蛋白序列

7. 用 *Not*I 酶切 pcDNAshCAR.6h。

8. 用 Klenow 片段补齐 3′端，然后加热使酶失活。

9. 用 *Xho*I 酶切质粒。

10. 连接 282bp 的带有 *Msc*I 和 *Sal*I 位点的片段和酶切后的 pcDNAshCAR.6h 质粒。

合成的质粒 pcDNAshCAR-EGF 编码重组融合蛋白，具备针对 CAR 和 hEGF 的结合能力。

## 制备能稳定表达 CAR/hEGF 融合蛋白的细胞

11. 用 *Pvu*I 酶切 pcDNAshCAR-EGF，使之线性化。

12. 用线性载体转染 293 细胞。
13. 转染 1d 后，将细胞接种入 96 孔板，用含 500μg/ml G418 的培养基筛选，直到大约 1/3 的细胞覆盖率。
14. 适当扩增细胞，以用于后续的分析。

### 纯化 CAR/hEGF 融合蛋白

15. 收集稳定表达 CAR/hEGF 的 293 细胞的培养基。
16. 加入等体积的预冷硫酸铵，沉淀蛋白质。
17. 离心收集沉淀，将之溶于原有体积 1/20 的 PBS 中。
18. 用 PBS 透析。
19. 用 TALON 含钴的金属亲合层析树脂（Clontech）纯化重组蛋白。
20. 用 PBS 透析。
21. 通过 Western 印迹检测表达的蛋白质。
22. 检测接头蛋白和 Ad 载体的靶向效率。
    a. 将接头蛋白结合到 Ad 载体上。
    b. 研究 EGFR-标记的 Ad 转染表达 EGFR 的细胞的靶向效率。

## 方案 3

# 转录靶向的 Ad 载体构建

本方案使用 AdEasy 系统，通过在 *E. coli* 内同源重组，构建能表达萤光素酶的重组 Ad 载体（参考第十五章 Ross 和 Parks 的方法）。TSP 被插入到萤光素酶基因的上游，以达到选择性表达控制。这里使用的所有载体都在缺失了 E1 区域的 Ad 载体骨架位置具有转基因表达框。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

AdEasy 系统（Qbiogene）
琼脂糖
菌株：BJ5183 和 DH5α
细胞株：293 细胞
氯化铯<!>
乙醇<!>
甘油
卡那霉素（25μg/ml）<!>

LB 培养基
磷酸缓冲液（PBS）
质粒载体：pGL3-Basic 载体（Promega）
限制性内切核酸酶：*Kpn*I、*Pac*I、*Pme*I、*Sal*I
此外，用于 Ad 载体同源重组、扩增、纯化的其他试剂参看第十五章 Ross 和 Parks 的方法。

仪器

用于同 Ad 载体源重组、扩增、纯化的其他仪器参看第十五章 Ross 和 Parks 的方法。

## 方法

1. 选择一个适当的 TSP 并将它克隆进 pGL3-Basic 载体（Promega）的多克隆位点。
   使用 CMV 作为阳性对照。
2. 将上述载体的"TSP-luciferase-poly（A）"区域剪切下来，并克隆到 pShuttle 的 *Kpn*I-*Sal*I 位点间。
   合成的质粒 pShuttle-promoter-luc 在 ΔE1 区域具有 TSP 和 luciferase 基因。
3. 在穿梭载体（pShuttle-TSP-Luc）和回收的 pAdEasy-1 载体间进行同源重组。
   a. 10μg 穿梭质粒载体用 *Pme*I 酶切 4h，获得线性片段，用 1%琼脂糖胶回收。
   b. 以 10∶1 比例混合线性化的穿梭质粒载体（pShuttle-TSP-Luc）和 pAdEasy-1。
   c. 将上述质粒混合物转化 BJ5183，用含卡那霉素 25μg/ml 的 LB 培养基 30℃培养过夜。
   d. 挑单克隆，小提质粒，检测是否具有预期的产物，重组的质粒大小是 35kb。
   正确的质粒包含 Ad 的基因组 pAd-TSP-Luc。
   e. 用 pAd-TSP-Luc 转化 DH5α，大量扩增。小提并纯化 DNA 样品。
4. 将 3μg pAd-TSP-Luc 用 *Pac*I 酶切 4h，用乙醇沉淀收集 DNA。
5. 通过脂质体转染法将线性化的 Ad 基因组 DNA 转染 293 细胞。
   转染后 5～14d 形成细胞病斑。
6. 当观察到完全的细胞病变效果后，用冻融法破碎细胞，收集 Ad 病毒。
7. 按如下方法扩增并纯化 Ad 载体：
   a. 通过悬浮培养的 293 细胞扩增病毒载体。
   b. 超速离心，然后再用 CsCl 密度梯度离心。
   c. 用含 10%甘油的 PBS 透析除去 CsCl。
8. 通过 293 细胞病斑试验测定病毒的浓度。
9. 检测合成的这个 Ad 病毒载体的靶向效率。
   萤光素酶只能在靶向细胞或组织的相应启动子作用下才能表达。

# 参考文献


Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Crowell R.L., and Finberg R.W. 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275:** 1320–1323.

Bilbao R., Gerolami R., Bralet M.P., Qian C., Tran P.L., Tennant B., Prieto J., and Brechot C. 2000. Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: The woodchuck animal model. *Cancer Gene Ther.* **7:** 657–662.

Breidenbach M., Rein D.T., Everts M., Glasgow J.N., Wang M., Passineau M.J., Alvarez R.D., Korokhov N., and Curiel D.T. 2004. Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther.* **12:** 187–193.

Culver K.W. and Blaese R.M. 1994. Gene therapy for cancer. *Trends Genet.* **10:** 174–178.

Davidoff A.M., Stevenson S.C., McClelland A., Shochat S.J., and Vanin E.F. 1999. Enhanced neuroblastoma transduction for an improved antitumor vaccine. *J. Surg. Res.* **83:** 95–99.

de Gruijl T.D., Luykx-De Bakker S.A., Tillman B.W., van den Eertwegh A.J., Buter J., Lougheed S.M., van der Bij G.J., Safer A.M., Haisma H.J., Curiel D.T., Scheper R.J., Pinedo H.M., and Gerritsen W.R. 2002. Prolonged maturation and enhanced transduction of dendritic cells migrated from human skin explants after in situ delivery of CD40-targeted adenoviral vectors. *J. Immunol.* **169:** 5322–5331.

Dmitriev I., Kashentseva E., Rogers B.E., Krasnykh V., and Curiel D.T. 2000. Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J. Virol.* **74:** 6875–6884.

Dmitriev I., Krasnykh V., Miller C.R., Wang M., Kashentseva E., Mikheeva G., Belousova N., and Curiel D.T. 1998. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* **72:** 9706–9713.

Douglas J.T., Miller C.R., Kim M., Dmitriev I., Mikheeva G., Krasnykh V., and Curiel D.T. 1999. A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat. Biotechnol.* **17:** 470–475.

Freeman S.M. and Zwiebel J.A. 1993. Gene therapy of cancer. *Cancer Invest.* **11:** 676–688.

Goldman C.K., Rogers B.E., Douglas J.T., Sosnowski B.A., Ying W., Siegal G.P., Baird A., Campain J.A., and Curiel D.T. 1997. Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* **57:** 1447–1451.

Haisma H.J., Grill J., Curiel D.T., Hoogeland S., Van Beusechem V.W., Pinedo H.M., and Gerritsen W.R. 2000. Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther.* **7:** 901–904.

Hakkarainen T., Hemminki A., Pereboev A.V., Barker S.D., Asiedu C.K., Strong T.V., Kanerva A., Wahlfors J., and Curiel D.T. 2003. CD40 is expressed on ovarian cancer cells and can be utilized for targeting adenoviruses. *Clin. Cancer Res.* **9:** 619–624.

Haviv Y.S., Blackwell J.L., Kanerva A., Nagi P., Krasnykh V., Dmitriev I., Wang M., Naito S., Lei X., Hemminki A., Carey D., and Curiel D.T. 2002. Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res.* **62:** 4213–4281.

Hemminki A., Dmitriev I., Liu B., Desmond R.A., Alemany R., and Curiel D.T. 2001. Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res.* **61:** 6377–6381.

Herrmann F. 1995. Cancer gene therapy: Principles, problems, and perspectives. *J. Mol. Med.* **73:** 157–163.

Huard J., Lochmuller H., Acsadi G., Jani A., Massie B., and Karpati G. 1995. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther.* **2:** 107–115.

Kanerva A., Mikheeva G.V., Krasnykh V., Coolidge C.J., Lam J.T., Mahasreshti P.J., Barker S.D., Straughn M., Barnes M.N., Alvarez R.D., Hemminki A., and Curiel D.T. 2002. Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **8:** 275–280.

Kashentseva E.A., Seki T., Curiel D.T., and Dmitriev I.P. 2002. Adenovirus targeting to c-*erb*B-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain. *Cancer Res.* **62:** 609–616.

Kawakami Y., Li H., Lam J.T., Krasnykh V., Curiel D.T., and Blackwell J.L. 2003. Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* **63:** 1262–1269.

Kirn D., Martuza R.L., and Zwiebel J. 2001. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat. Med.* **7:** 781–787.

Korn T., Nettelbeck D.M., Volkel T., Muller R., and Kontermann R.E. 2004. Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: A comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J. Gene Med.* **6:** 642–651.

Krasnykh V.N., Mikheeva G.V., Douglas J.T., Curiel D.T. 1996. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* **70:** 6839–6846.

Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Kupsch J., Dieckmann D., Douglas J.T., Kontermann R.E., Alemany R., and Curiel D.T. 2004. Retargeting of adenoviral infection to melanoma: Combining genetic ablation of native tropism with a recombinant bispecific single-chain diabody (scDb) adapter that binds to fiber knob and HMWMAA. *Int. J. Cancer* **108:** 136–145.

Pereboev A.V., Nagle J.M., Shakhmatov M.A., Triozzi P.L., Matthews Q.L., Kawakami Y., Curiel D.T., and Blackwell J.L. 2004. Enhanced gene transfer to mouse dendritic cells using adenoviral vectors coated with a novel adapter molecule. *Mol. Ther.* **9:** 712–720.

Reynolds P.N., Dmitriev I., and Curiel D.T. 1999. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther.* **6:** 1336–1339.

Schmidt-Wolf G. and Schmidt-Wolf I.G. 1994. Human cancer and gene therapy. *Ann. Hematol.* **69:** 273–279.

Stevenson S.C., Rollence M., Marshall-Neff J., and McClelland A. 1997. Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J. Virol.* **71:** 4782–4790.

Stevenson S.C., Rollence M., White B., Weaver L., and McClelland A. 1995. Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J. Virol.* **69:** 2850–2857.

van der Eb M.M., Cramer S.J., Vergouwe Y., Schagen F.H., van Krieken J.H., van der Eb A.J., Rinkes I.H., van de Velde C.J., and Hoeben R.C. 1998. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther.* **5:** 451–458.

Varga M.J., Weibull C., and Everitt E. 1991. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.* **65:** 6061–6070.

Varnavski A.N., Calcedo R., Bove M., Gao G., and Wilson J.M. 2005. Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naive and pre-immunized mice. *Gene Ther.* **12:** 427–436.

Volk A.L., Rivera A.A., Kanerva A., Bauerschmitz G., Dmitriev I., Nettelbeck D.M., and Curiel D.T. 2003. Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: Incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism. *Cancer Biol. Ther.* **2:** 511–515.

Von Seggern D.J., Huang S., Fleck S.K., Stevenson S.C., and Nemerow G.R. 2000. Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: Improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J. Virol.* **74:** 354–362.

Wickham T.J., Mathias P., Cheresh D.A., and Nemerow G.R. 1993. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73:** 309–319.

Wickham T.J., Tzeng E., Shears L.L 2nd, Roelvink P.W., Li Y., Lee G.M., Brough D.E., Lizonova A., and Kovesdi I. 1997. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* **71:** 8221–8229.

# 第十八章　用于 AAV 组装的能稳定制造病毒的细胞系

Gilliane Chadeuf 和 Anna Salvetti

Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649, CHU Hôtel-Dieu, Bâtiment Jean Monnet, 44035 Nantes, France

华中和吕青　译



## 摘要

通过辅助病毒来感染病毒制造细胞的克隆，含有 *rep* 和 *cap* 基因的稳定的病毒制造细胞系和 rAAV（重组腺联病毒）载体为 rAAV 储存库的建立提供了一个可靠而有效的程序。然而，这一类细胞系的建立耗时较久。因此，只有在需要大量的 rAAV 时才推荐使用这种方法，如在大量动物体上进行的临床前研究等。

## 引言

1995 年，Clark 等人指出，rAAV 可以通过稳定细胞系获得。这些研究者用 AAV-2 *rep* 和 *cap* 基因以及一个可整合到 HeLa 细胞基因组的 rAAV 载体构建了 HeLa 细胞克隆。通过用野生型腺病毒来进行感染，该克隆可有效组装重组的腺病毒颗粒。尽管没有病毒的反向终端重复序列，通过腺病毒感染，这些稳定细胞系也能够显著地扩增 *rep-cap* 基因。本方案描述的是获得稳定的制造 rAAV 的细胞系的实验技术。在这个两步骤的实验过程中，可获得含有 *rep* 和 *cap* 基因的稳定细胞克隆，然后用这些克隆来生产含整合的 rAAV 载体的病毒制造细胞克隆（图 1）。

| 第一步：稳定的包装细胞克隆的分离 | |
|---|---|
| 用 pRC 和 pPGK-neo$^{R}$ 转染 HeLa 或 A549 细胞 | 第 2 天 |
| 胰蛋白酶消化并且以不同稀释度种板 | 第 3 天 |
| G418 筛选 | 第 4 天 |
| 抗 G418 克隆的分离和扩增 | 3～4 周 |
| PCR 分析检测含 *rep-cap* 的克隆 | 5～8 周 |
| PCR 阳性的含 *rep-cap* 克隆的 Southern 核酸杂交筛选 | 8～10 周 |
| 为 rAAV 的生产筛选 *rep-cap* 克隆 | 10～12 周 |

| 第二步：稳定的病毒制造细胞克隆的分离 | |
|---|---|
| 用 pAAV 和 pSV-hygro$^{R}$ 转染包装细胞 | 第 2 天 |
| 胰蛋白酶消化并且以不同稀释度接种孔板 | 第 3 天 |
| Hygromycin B 筛选 | 第 4 天 |
| 抗 Hygromycin B 克隆的分离和扩增 | 3～4 周 |
| PCR 分析检测含 rAAV 的克隆 | 5～8 周 |
| 筛查产 rAAV 的 PCR 阳性克隆 | 8～10 周 |
| 稳定性分析以及大量生产 rAAV | 10～14 周 |

图 1. 分离稳定的包装细胞系和病毒制造细胞系的筛选步骤

# 方案

## 稳定的 rAAV 制造细胞的构建技术

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

AAV 质粒

pAAV：在质粒的骨架中克隆了 rAAV 载体的重组质粒

pRC：含有在其原始操纵子下表达的 AAV *rep* 和 *cap* 基因但不带病毒反向终端重复序列的质粒

这些质粒的性质将随造出的 AAV 的血清型和所使用 rAAV 载体而不同。

细胞培养基

DMEM（Sigma-Aldrich）培养基，含有 10%胎牛血清（研究级别）、1%青霉素（50U/ml）<!>和链霉素（Cambrex，50μm/ml）<!>

G418 储存液（100mg/ml，*m*/*V*）

将 5g G418（Invitrogen）溶解于 50 ml 无菌蒸馏水中，然后将储存液用 0.2μm 滤器过滤并存储在−20℃。

HeLa（ATCC CCL-2）或 A549（ATCC CCL-185）细胞

潮霉素 B 储存液（10mg/ml，*m*/*V*）

将 1g 潮霉素 B（Invitrogen）溶解于 100ml 无菌蒸馏水中，然后将储存液用 0.2μm 滤器过

滤并存储在−20℃。

选择性质粒

pPGK-*neo*：该质粒在鼠磷酸甘油酸盐激酶-1启动子控制下编码新霉素抗性基因

pSV-*hygro*：该质粒在病毒SV40启动子控制下编码潮霉素抗性基因

任何可表达选择性标记的重组质粒都可以替代这两个质粒。

1×胰蛋白酶< !>/EDTA溶液

将10×胰蛋白酶< !>/EDTA储存液（Sigma-Aldrich）用无菌0.9% NaCl稀释，将溶液存储在−20℃。

野生型腺病毒5（Ad5）（ATCC VR-5）

## 方法

### 稳定的包装细胞系的构建

1. 在转染前24h，将HeLa或A549细胞接种于10cm组织培养盘中，密度为$3\times10^6$个。

   每种细胞系的密度不同，必须保证转染前细胞汇合度能达到50%～80%。

2. 用$CaPO_4$将10μg pRC和1.0μg pPGK-*neo*共转染细胞。
3. 24h后，胰蛋白酶消化细胞，梯度稀释悬浮细胞（1/5、1/10、1/20、1/40），然后将每个稀释度的细胞重新接种10cm细胞盘（两个拷贝）。培养细胞20～24h。
4. 吸去细胞培养基并且加入新鲜的含1mg/ml G418的培养基。
5. 继续培养细胞3～4周，每2d更换一次含1mg/ml G418的培养基。

   在转染后7～14d内大量的细胞死亡，转染后3～4周单克隆开始出现，在此期间内，保持对细胞的G418选择压力是很重要的。

6. 从底部观察和标记单个的克隆，然后分离单克隆。胰蛋白酶消化克隆后，使用克隆环或移液器吸头从培养板上刮去单克隆。
7. 将单克隆细胞在无G418培养基中培养扩增该克隆，使之铺满两个10cm细胞板。
8. 收集一个10cm培养板上的细胞并−80℃冻存（每瓶约$5\times10^6$个细胞），用另外一个培养板上的细胞制备基因组DNA。

### 筛选存在*rep*和（或）*cap* DNA的克隆

9. 在病毒感染24h前，融化并扩增PCR阳性克隆，然后将细胞接种到6孔细胞板上的两个孔内（每孔约$5\times10^5$个细胞）。

   使用合适的引物以基因组DNA为模板扩增*rep*和（或）*cap* DNA来筛选克隆，同时以pRC质粒为阳性对照。

10. 对于HeLa和A549细胞，以感染复数为50的情况下用野生型Ad5感染其中的一孔细胞。

    调整感染复数使被感染细胞达到90%，在被感染细胞孔内能清晰的观察到细胞病变。

11. 感染 48h 后收集细胞，并使用标准的方法制备基因组 DNA。用一个识别 *rep* 或 *cap* 基因的探针，通过 Southern 核酸杂交来分析 *rep-cap* 的扩增（图 2)。

12. 将显示出腺病毒诱导 *rep-cap* 扩增的细胞克隆接种到 6 孔板，用 pAAV 质粒转染（每孔 2μg)，并且用野生型 Ad5 感染（感染复数为 50)。

    制备的 rAAV 颗粒在细胞裂解物中的数目可以通过斑点印迹杂交分析直接测量出来。作为阳性对照，使用 pRC 和 pAAV 质粒共转染以及野生型 Ad5 感染的 293 细胞来制备 rAAV（感染复数为 5)。

13. 扩增每个细胞能制备至少 $10^4$ 个 rAAV 颗粒的克隆，并于 −20℃储存细胞。

    对这些细胞克隆进一步的分析包括，稳定性分析确定在 30 代内能否稳定的制备 rAAV 颗粒；另外，野生型 Ad5 感染细胞后，用蛋白质印迹方法来分析 Rep 和 Cap 蛋白的合成。

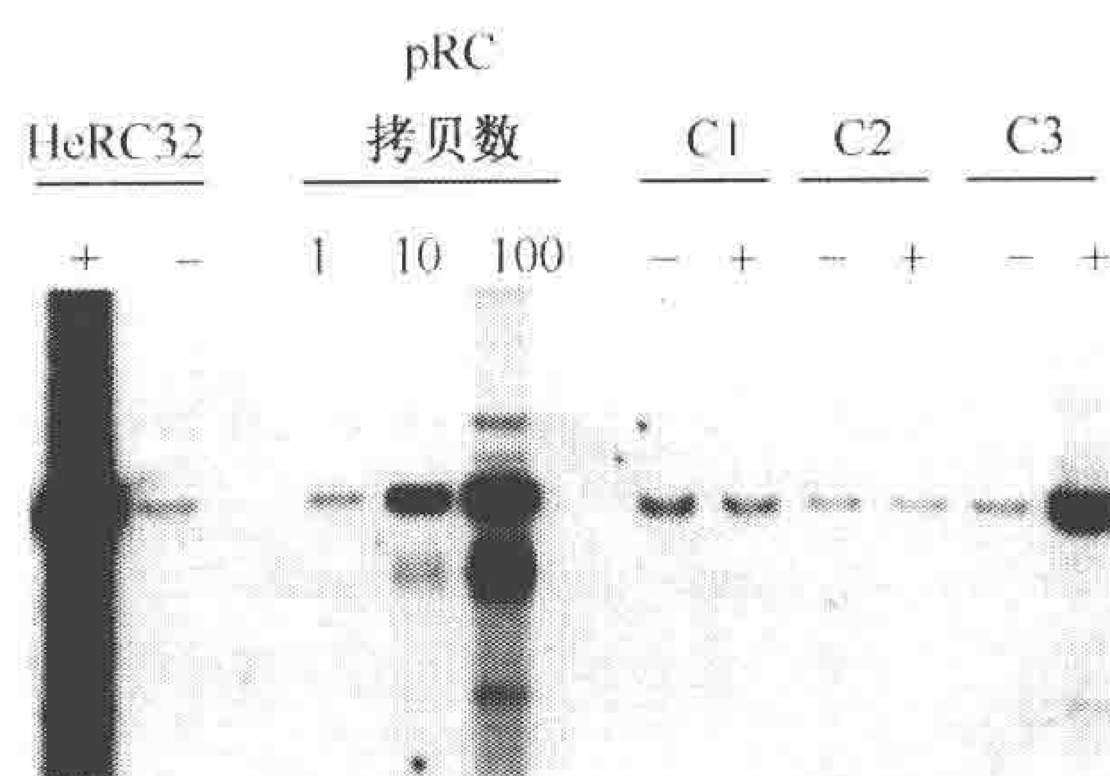



图 2. 通过 Southern 核酸杂交来检测 *rep* 基因的扩增。从感染（+）的三个不同的稳定 *rep-cap* 细胞克隆（C1、C2 和 C3）或没有感染（−）野生型 Ad5 的细胞克隆中提取基因组 DNA，使用一个 *rep* 探针通过 Southern 杂交来分析经合适的酶消化后的基因组 DNA。尽管这三个克隆中都有整合的 *rep* 序列，但只有 C3 克隆中检测到了腺病毒诱导的这些序列的扩增，在 HeRC32 包装细胞中同样观测到该序列的扩增。

## 稳定的病毒制备克隆的构建

14. 在转染 24h 前，将准备的包装细胞克隆接种在 10cm 组织培养盘中，密度为 $3\times10^6$ 个。

15. 用 $CaPO_4$ 将 10μg pAAV 和 1.0μg pSV-*hygro* 共转染细胞。

16. 24h 后，胰蛋白酶消化细胞，梯度稀释悬浮细胞（1/5、1/10、1/20、1/40)，然后将每个稀释度的细胞重新接种 10cm 细胞盘（两个拷贝）。培养细胞 20～24h。

17. 吸去细胞培养基并且加入新鲜的含 0.3mg/ml 潮霉素 B 的培养基。

18. 继续培养细胞 3～4 周，每 2d 更换一次含 0.3mg/ml 潮霉素 B 的培养基。

19. 从底部观察和标记单个的克隆，然后分离单克隆。胰蛋白酶消化单克隆后，使用克隆环或移液器吸头从培养板上刮去单克隆。

20. 将单克隆细胞在无潮霉素 B 培养基中培养扩增，使之铺满两个 10cm 细胞板。

21. 收集一个 10cm 培养板上的细胞并于 −80℃冻存（每瓶约 $5\times10^6$ 个细胞），用另外一个培养板上的细胞制备基因组 DNA。

22. 在 6 孔板上种板 PCR 阳性克隆，并且使之感染野生型 Ad5（感染复数为 50)，通过斑点印迹杂交来确定 rAAV 颗粒制备的效率。

    对这些阳性克隆进一步的分析包括，Southern 杂交分析检测每个细胞内 rAAV 载体的拷贝数；稳定性分析检测在 30 代内 rAAV 颗粒的制备水平，以及确定大量 rAAV 的制备。

## 疑难解答

问题：产生了污染的辅助病毒。
解决方法：可以用野生型 Ad5 替代复制缺陷型的辅助病毒。

## 致谢

我们感谢 Jacques Tessier、Véronique Blouin 和 Estelle Toublanc 建立了本方案。本工作得到了 French Musular Dystrophy Association、Association Nantaise pour la Thérepie Génique（ANTG）、Fondation pour la Thérapie Génique en pays de la Loire 和 INSERM 的支持。

## 参考文献

Chadeuf G., Favre D., Tessier J., Provost N., Nony P., Kleinschmidt J., Moullier P., and Salvetti A. 2000. Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable *rep-cap* HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated *rep-cap* genome. *J. Gene Med.* **2:** 260–268.

Clark K.R., Voulgaropoulou F., Fraley D.M., and Johnson P.R. 1995. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **6:** 1329–1341.

Gao G.P., Lu F., Sanmiguel J.C., Tran P.T., Abbas Z., Lynd K.S., Marsh J., Spinner N.B., and Wilson J.M. 2002. *rep/cap* gene amplification and high-yield production of AAV in an A549 cell line expressing *rep/cap*. *Mol. Ther.* **5:** 644–649.

Liu L., Clark K.R., and Johnson P.R. 1999. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using a packaging cell line and a hybrid recombinant adenovirus. *Gene Ther.* **6:** 293–299.

Liu X., Voulgaropoulou F., Chen R., Johnson P.R., and Clark K.R. 2000. Selective *rep-cap* gene amplification as a mechanism for high-titer recombinant AAV production from stable cell lines. *Mol. Ther.* **2:** 394–403.

Salvetti A., Orève S., Chadeuf G., Favre D., Cherel Y., Champion-Arnaud P., David-Ameline J., and Moullier P. 1998. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* **9:** 695–706.

Snyder R., Xiao S., and Samulski R.J. 1996. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In *Current protocols in human genetics* (ed. N. Dracopoli et al.), pp. 12.1.1–12.1.23. John Wiley & Sons, New York.

Tessier J., Chadeuf G., Nony P., Avet-Loiseau H., Moullier P., and Salvetti A. 2001. Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus *rep-cap* sequences. *J. Virol.* **75:** 375–383.

Toublanc E., Abdellatif B., Bonnin D., Blouin V., Brument N., Cartier N., Epstein A.L., Moullier P., and Salvetti A. 2004. Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J. Gene Med.* **6:** 555–564.

# 第十九章　腺相关杂合病毒载体的设计方法

Aravind Asokan 和 R. Jude Samulski

Gene Therapy Center，University of North Carolina，Chapel Hill，North Carolina 27599

付超和叶文彬　译



## 摘要

腺相关杂合病毒（AAV）载体能被用来进行组织特异性基因的表达或对难感细胞类型的转导。一直以来，可利用包括化学偶联、肽配体插入和构建附加表位的衣壳亚基融合载体等一系列的生化技术将 AAV 转导进特定的组织类型中。AAV 载体靶向领域的最新进展包括一些综合性技术的应用，如 AAV 衣壳肽展示库、易错 PCR 和 DNA 改组。可通过自然突变和重组产生不同组织嗜性的 AAV 血清型，从而将 AAV 转导到一些难感的细胞类型中去。另外，可利用血清同源体，用核衣壳移植或标记拯救技术用不同的血清型构建杂合载体。因为 AAV2 是了解最为透彻的血清型，这个血清型一般被用来作为构建 AAV 杂合载体的模板。本章主要介绍构建具有扩大的组织嗜性的杂合 AAV 载体的方法。

## 引言

由于其相对低的免疫原性和相对高的转导效率，重组型 AAV 血清型 2（AAV2）已成为人类基因治疗的热点。然而，一些研究表明，AAV2 载体在一些组织类型中的转染效率低于转基因表达所需的水平（Zabner et al. 2000；Thomas et al. 2004）。现在迫切需要使基因能在对 AAV2 不感受的细胞类型中表达，控制载体的扩散，减少体内所需载体的剂量。为了实现这些目标，研究重点集中在通过用组织特异性的启动子和修饰 AAV 衣壳来构建有强转导效率和（或）靶向效率的载体（表 1）。到目前为止，已有 11 种灵长类动物的 AAV 血清型被克隆、测序并发展成为基因治疗载体。由于这些血清型

的高效率，能减少所需载体的剂量。它们之所以比 AAV2 载体更有优势，还因为它们能避开已存在的，由自然感染 AAV 载体或曾用 AAV 载体处理而引起的体液免疫反应所产生的中和性抗体（Peden et al. 2004）。

**表 1. 不同 AAV 血清型载体在主要组织中的相对转导效率**

| 组织类型 | 最优血清型 | 引用文献 |
|---|---|---|
| 肝脏 | AAV8、AAV9[a] | Grimm et al. 2003 |
| 胰岛 | AAV8 | Wang et al. 2004；Loiler et al. 2005 |
| 肺 | AAV1、AAV6、AAV9[a] | Halbert et al. 2001 |
| 心脏 | AAV8、AAV9[a] | Wang et al. 2005 |
| 骨骼肌 | AAV1、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9[a] | Xiao et al. 1999；Blankinship et al. 2004；Louboutin et al. 2005；Wang et al. 2005 |
| 脑 | AAV1、AAV5、AAV4 | Davidson et al. 2000；Burger et al. 2004 |
| 肾脏 | AAV2 | Takeda et al. 2004 |
| 眼睛 | AAV4、AAV5 | Lotery et al. 2003；Weber et al. 2003 |

a 美国基因治疗协会年会（2005）中的多篇摘要

AAV 血清型的组织嗜性可能是由于病毒与细胞表面特异性受体结合和胞内处理过程共同作用的结果（Ding et al. 2005）。对 AAV 血清型衣壳的晶体结构和其相应功能的了解，对于阐明组织嗜性的作用机制和设计杂合载体都是至关重要的。用 X 射线晶体衍射确定了 AAV2 的晶体结构，分辨率达到 3Å（Xie et al. 2002），同时，利用冷冻电子显微镜和图像重构技术，也阐明了 AAV4（Padron et al. 2005）和 AAV5（Walters et al. 2004）的结构，分辨率分别达到 13Å 和 16Å。对其他主要的 AAV 血清型如 AAV1 和 AAV8 的衣壳晶体结构的研究也正在进行中。

最近，一种称作“交叉包装”的方法被用来构建核衣壳移植的 AAV 载体。如果 AAV2 Rep 蛋白和不同血清型的衣壳蛋白共同表达，能产生包裹 AAV2 载体基因的病毒颗粒（Rabinowitz et al. 2002）。另外，在昆虫 Sf9 细胞中用杆状病毒表达载体系统构建 AAV 载体的方法也得到了发展。一些实验小组已利用交叉包装的方法来比较 AAV 血清型载体在不同组织中的转导效率。

## 具有不同嗜性的 AAV 载体

AAV 病毒颗粒的衣壳是由三个 60 个拷贝的相关蛋白质 VP1、VP2 和 VP3（Rose et al. 1974）所组成的 $T=1$ 的二十面体。这三个蛋白质有相同的羧基端，但由于利用不同的起始密码子，因此有不同的氨基端。蛋白质的核心部分由一个保守的八股反平行 β 桶结构组成。表面可变结构主要由插入 β 桶之间的大段环结构组成。这段可变区包括一级序列的中心（残基 440～600，以 AAV2 VP1 为例），而位于氨基端和羧基端的残基是保守的。不同 AAV 血清型之间变化最大的区域位于残基 260 和 380 附近（以 AAV2 VP1 为例）。随着对 AAV 衣壳结构的深入了解，通过定点/插入突变对 AAV 衣壳结构进行适当修饰，成为一种有潜力的构建新 AAV 载体的手段。从这点来看，可利用包括化学偶联、肽配体插入和构建附加表位的衣壳亚基融合载体等一系列的生化技术，将 AAV 转导至特定的组织类型中。AAV 载体靶向领域的最新进展包括一些综合

性技术的应用，如通过易错 PCR 和 DNA 改组构建大的随机突变 AAV 库。适当的设计和综合性方法的结合，使得发展适合个体病例和（或）患者特征的新 AAV 载体在未来成为可能。

## 肽段配体的插入

可通过在 AAV 载体的衣壳序列中插入相应的配体肽段，从而使其能结合到特定细胞类型的受体上。这涉及将编码特定受体的配体的肽段序列插入到衣壳的可读框中。必须注意到，插入位点的选择不能影响病毒颗粒的活性，并能正确显示在衣壳表面，从而能将配体呈递给受体。目前为止，所有对 AAV 载体靶向的努力都限制在修饰 AAV2 的表面结构上（Nicklin and Baker 2002；Buning et al. 2003）。

在能得到 AAV2 的晶体结构信息之前（Xie et al. 2002），通过对衣壳可读框进行插入突变（Rabinowitz et al. 1999；Shi et al. 2001）并大规模筛选突变（Wu et al. 2000），已经确认了一些能耐受在细胞表面显示的外源表位插入的位点。例如，利用红血球凝集素附加表位的插入，确定了衣壳表面的一些区域（Wu et al. 2000）。这些包括位于 VP1 区域或假定的 VP3 环区域的氨基酸 1、34、138、266、447、591 和 664（以 VP1 为例）间的插入。相关研究表明，在衣壳表面显示外源性表位依赖于合适的支架序列（Shi et al. 2001）。已确定了最优的支架序列和 5 个外源表位插入位点。这 3 个蛋白质每个都有这些位点，因此每个载体颗粒都能显示 3、6 或 60 个表位。类似的，代表 VP1 独特区末端的 138 位点，能耐受来源于脂蛋白 E 的配体的插入，从而能靶向低密度脂蛋白受体（Loiler et al. 2003）。

在设计 AAV 载体靶向时，一个重要的考虑是插入的肽段是否破坏了内源性受体的作用。保守的内源性受体结合位点导致载体有扩大的嗜性，而不是选择性的。另外，在能破坏内源性受体结合的位点插入配体，有利于选择性靶向。例如，AAV2 的嗜性很广，可能是由于蛋白聚糖硫酸乙酰肝素在细胞表面的广泛表达（Summerford and Samulski 1998）。对那些与硫酸乙酰肝素结合（Kern et al. 2003；Opie et al. 2003）有关的残基的确定和突变，能为构建不依赖于硫酸乙酰肝素机制的 AAV 衣壳提供“去靶向”的平台。一个有力的例子是，将载体 484 位和 585 位的精氨酸残基（对肝素结合很重要）突变成谷氨酸，导致其靶向心脏，而不再是肝脏（Kern et al. 2003）。

通过对一些插入位点的测试，587 位因为能破坏 AAV2 与肝素的结合而受到关注。Girod 等（1999）利用这个表面环位点，将能被很多凝集素识别的 RGD 基序插入这个位点。这个经过修饰的载体能转染表达凝集素受体的 B16F10 细胞系，而后者原本对重组 AAV2 感染并不感受。另外，Grifman 等（2001）报道，插入能结合氨基肽酶或 CD13 受体的包括 NGR 序列的肽段，能使载体选择性的靶向肿瘤脉管系统。在类似的研究工作中，通过噬菌体展示已确定其他一些细胞类型特异性肽段。分别将包含序列 SIGYPLP 和 MTP（选择性靶向内皮细胞）的肽段和包含 FYH 核心基序（靶向平滑肌细胞）的肽段插入 587 位点，能成功地对特定细胞类型进行转导（Nicklin et al. 2001；White et al. 2004；Work et al. 2004）。目前，还没有对 AAV 进入细胞/胞内运输过程中与不同受体结合的配体的替换效果的全面研究。对在 AAV 感染过程中，受体-配体相互作用的内在地位的彻底了解，还需要将体内和体外的晶体结构信息和生化/生物研究

结合起来。

### 肽段展示文库

噬菌体展示文库的原理也被应用到在第587位有随机肽段库的AAV载体上。这种综合性方法使AAV载体突变体能在体外实验中靶向特定的细胞类型（Muller et al. 2003；Perabo et al. 2003）。不同于通过结构分析后插入肽段，这些方法包括对能感染特定细胞类型的衣壳基因的拯救、扩增和序列分析。原则上，这种方法保证经过修饰的病毒不仅是与细胞表达受体结合最优的，也是转导目标细胞效率最高的。Perabo等（2003）用侧翼连有丙氨酸的7个随机氨基酸残基构建了AAV库。这些在MO7e和Mecl细胞中连续传代，而这两种细胞本是对AAV2转导是不反应的。从MO7e细胞中拯救的载体含有一个RGD基序核心，而那些从Mecl细胞中拯救的载体也能高效地转导初始B-CLL细胞。在类似的研究中，Muller等（2003）挑出了对冠状动脉内皮细胞转导效率升高了600倍的载体。另外，在体内实验中，一个测试的载体对心脏组织有嗜性，而对肝脏的转导效率较低。

### 衣壳亚基-配体融合蛋白

单个AAV衣壳蛋白的独立表达，使得对这些蛋白质进行修饰变得容易，其中包括将大的肽段或蛋白质与AAV衣壳亚基融合。合成这种载体所需的技术与构建嵌合型AAV载体相似（Rabinowitz et al. 2004），在这个过程中，没有经过修饰的亚基保留了衣壳的整合性，而与亚基融合的载体在组装过程中整合进入衣壳。最初的例子是将一段能识别CD34的单链抗体片段与VP2衣壳蛋白的氨基端融合（Yang et al. 1998），从而改变了AAV2的靶向。在有野生型VP2时，这种载体能形成既包括野生型VP2，又包括经修饰的VP2蛋白的嵌合颗粒。为了与特异的衣壳蛋白融合，这三种衣壳蛋白在强细胞巨化病毒（CMV）启动子的控制下分开表达。因为VP1和VP3不能耐受这种融合，单链抗体与VP2氨基端融合，从而产生能选择性转导CD34细胞系的载体颗粒，尽管效率较低。然而，由于其他实验室无法重复出这个实验，所以至今仍不清楚是否组装成了稳定的病毒颗粒或形成了病毒蛋白质的聚合体。

最近的一项研究表明，VP2亚基的氨基末端是能与大至30kDa的蛋白质融合的新位点（Warrington et al. 2004）。VP2融合载体能与不同比例的未经修饰的VP1和VP3亚基反式转导。利用这种技术，能在AAV颗粒的VP1和VP2或仅在VP2的第138位残基后插入大片段配体，如老鼠fractalkine蛋白中的8kDa趋化因子结合域、18kDa的人类激素leptin或绿色荧光蛋白（GFP）。尽管在VP1的第138残基进行插入大大降低了感染活力，但在VP2的第138位残基进行插入，对病毒颗粒的组装或感染只有很小影响。

### 化学偶联方法

一些不需要对AAV衣壳基因序列进行修饰的间接靶向AAV载体的方法也有报道。这些方法具有能偶联任何大小配体的优点。例如，双特异性抗体能调节AAV衣壳蛋白和人类巨核细胞表面特异性受体之间的相互作用（Bartlett et al. 1999）。另一种方法是

形成带有生物素（biotin）分子的 AAV 化学衍生物，从而使链霉亲和素（streptavidin)-配体融合蛋白非共价地吸附到衣壳表面（Ponnazhagan et al. 2002）。尽管在体外实验中，这些偶联的载体能成功地靶向 αIIbβ3 凝集素、表皮生长因子和纤维原生成因子受体（Ponnazhagan et al. 2002)，但它们在体内的稳定性还需进一步观察。将用于靶向的配体直接化学偶联到衣壳表面，有可能会使衣壳的一些关键氨基酸失活，因此目前还没有进行这方面的工作。

Ried 等（2002）提出了另一种将用于靶向的基序偶联到 AAV 衣壳表面的方法。这种方法包括将蛋白 A（Z34C）IgG 结合域的 34 个残基片段插入到第 587 位上。然后，将 CD29、CD117 或 CXCR4 的单克隆抗体偶联到载体表面，用于选择性的靶向相应的受体，尽管效率很低。限制每个病毒颗粒上 Z34C 片段的数量，对单克隆抗体偶联到载体表面的能力并没有影响，却使得重组的 AAV2 能以较高的转导效率选择性的靶向 CD29 和 CD117 受体。尽管 Z34C 片段的插入导致病毒颗粒的产量和感染滴度下降，利用嵌合型衣壳的方法能提高 Z34C 载体颗粒的产量（Gigout et al. 2005）。

### 嗜性扩大的 AAV 载体

以下的实验方法描述了构建扩大组织嗜性 AAV 载体的方法。通过自然突变和重组所得到的一些 AAV 血清型为基因治疗提供了不同的载体（Grimm and Kay 2003）。另外，血清同源体的方法能被用来将不同血清型的特点进行混合和配对。因此，能通过利用从 AAV 血清型得来的 AAV 载体（方案 1）和由核衣壳移植（方案 2）或标记拯救（方案 3）构建的杂合 AAV 血清型载体，从而扩大 AAV 对难感性组织类型的嗜性。

## 方案 1

## AAV 血清型载体的构建

构建重组 AAV 血清型载体需要将下列质粒转染到宿主 293 细胞中：①含有侧翼连有反向末端重复序列（ITR）的转基因表达框的载体基因组；②能反式表达 AAV2 Rep 蛋白和 AAV 血清特异型 Cap 蛋白的 AAV 帮助质粒；③腺病毒帮助基因。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

benzonase 核酸酶（Sigma-Aldrich）

细胞：人类胚胎肾细胞 293（ATCC）

氯化铯（Sigma-Aldrich）< !>

加有 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基（Sigma-Aldrich）< !>

溶于双蒸馏水的亮肽素（leupeptin）（3μg/ml）（Sigma-Aldrich）< !>

无 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ 的磷酸盐缓冲液（PBS）（Sigma-Aldrich）

质粒

AAV 血清型帮助质粒（如 pXR1、pXR2、pXR3、pXR4 和 pXR5；UNC 载体核心）

腺病毒帮助质粒（如 pXX6-80；UNC 载体核心）

AAV 转基因包装框（如 pTR-CMV-GFP；UNC 载体核心）

Superfect 转染试剂盒（QIAGEN）

Trypsin-EDTA（Sigma-Aldrich）<!>

## 仪器

离心和超速离心系统（Sorvall RT 6000B）

离心管（16mm×76mm）(Beckman polyallomer Quick-Seal)

透析卡（Pierce Slide-A-Lyzer）(10 000kDa m. w. cutoff)

超声波破碎机（3mm 探针）

带有 TLN100 转头的超速离心机（Beckman Optima TLX）

## 方法

1. 用胰酶消化 15cm 板上汇合的 HEK 293 细胞（约 $2\times10^{7}$ 个）。按 1∶3 的比例用培养基稀释。重新接种并过夜。
2. 根据制造商的说明，用 Superfect 转染试剂盒，每块板（共 5～10 块）转染 7μg 的 pTR-CMV-GFP（转基因包装框）、15μg 的 pXX6-80（腺病毒帮助质粒）和 10μg 的 AAV 血清型帮助质粒（pXR1～pXR5）。
3. 转染后 48～50h 用细胞刮收获细胞。

   除有特别规定外，所有以下的操作在冰上进行。
4. 1000r/min（Sorvall RT 6000B）离心细胞。用亮肽素重悬。
5. 在 duty 设为 50%，output control setting 设为 2 的条件下，用 25 bursts 超声波破碎细胞。
6. 1000r/min 离心，除去细胞碎片。
7. 加 benzonase 核酸酶至最终浓度为 1.2U/μl。
8. 37℃孵育 30～60min。
9. 每毫升裂解液中加 0.6g 氯化铯。将悬液转移到 Beckman 管内。
10. 用带 TLN 100 转头的 Beckman Optima TLX 超速离心机，将混合液 100 000r/min 离心 4h。
11. 用使用放射性标记的探针（GFP 转基因）的斑点杂交确定梯度中的最高洗脱峰。
12. 在冰室中，使用 Pierce 透析卡，用 PBS 过夜透析洗脱峰，然后测定病毒滴度（每毫升载体基因的数量）。

## 方案 2

# 通过核衣壳移植构建嵌合载体

一个嵌合病毒颗粒可以定义为由来源于不同血清型的衣壳亚基混合组装而成的衣壳结构。可通过混合编码不同血清型衣壳蛋白的帮助质粒，或编码同一血清型的野生型和突变型衣壳蛋白的帮助质粒，或同一血清型的两种不同突变型衣壳亚基的帮助质粒来构建这样的病毒颗粒（图 1，见彩版）。理论上，嵌合颗粒中不同来源的衣壳亚基的比例，反映了不同类型 AAV 帮助质粒的加入比例，尽管这点还没得到实验的认证。这个技术的独特优势是能将不同来源的特征有选择地结合起来，从而协同增强转基因的表达。下面的实验方法是由 Rabinowitz 等（2004）的方法改进而来的，能通过按一定比例混合不同的 AAV 血清型来构建嵌合载体。

构建嵌合载体所需的材料和设备与方案 1 中的一样。

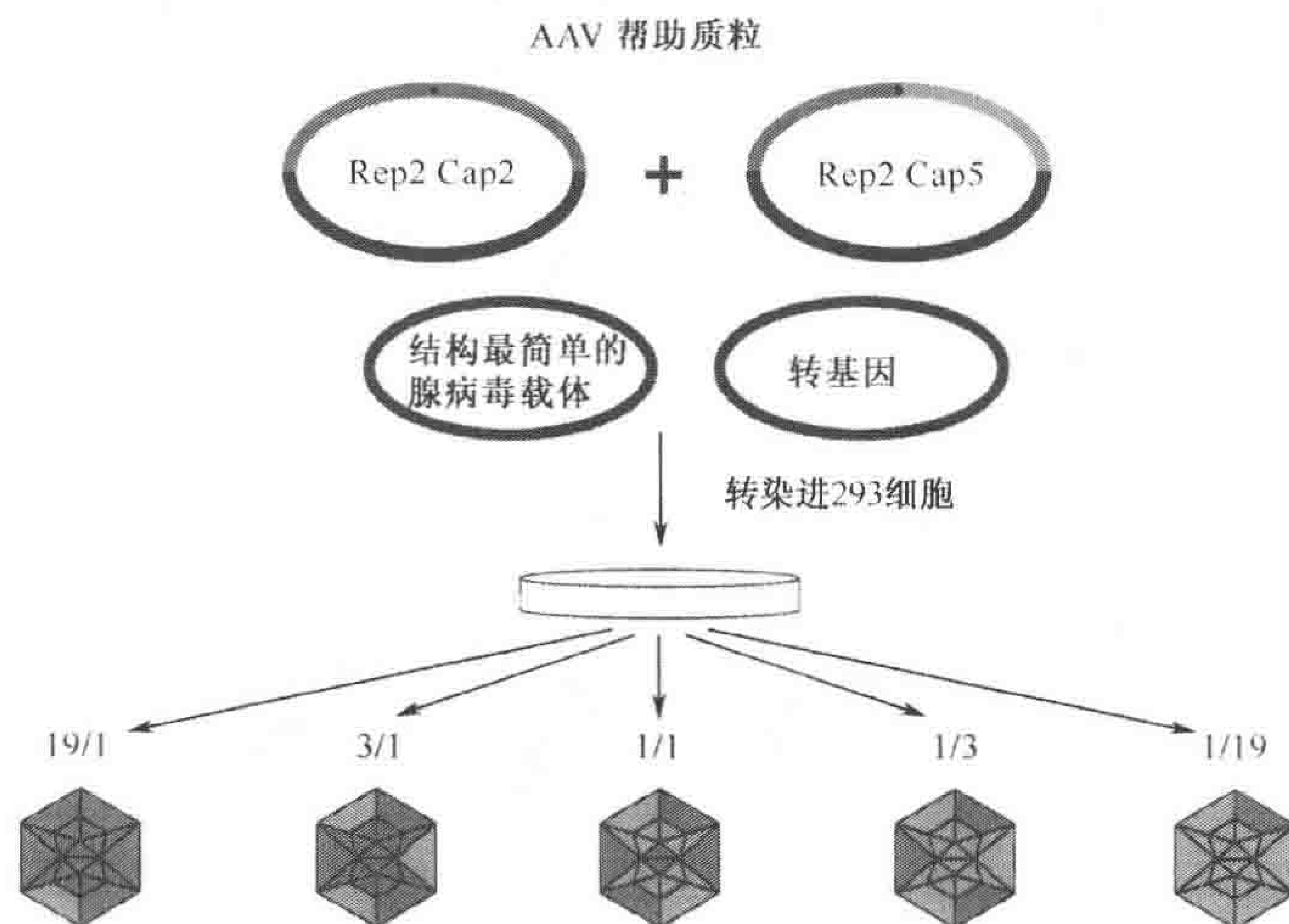



图 1. 通过混合质粒的方法构建嵌合 AAV 衣壳（方案 2）（Rabinowitz et al. 2004）。含有来源于任何两个 AAV 血清型（如蓝圈中的 Cap2 和红圈中的 Cap5）衣壳基因的帮助质粒 DNA 按照三质粒转染方法（Xiao et al. 1998）按不同质量比（19∶1、3∶1、1∶1、1∶3 和 1∶19）进行共转染，以此在 293 细胞中构建 AAV 载体。拓扑图表明用这种技术产生的嵌合病毒衣壳，不同的颜色表明不同亚基的比例，这也表明在转染混合物中含有每种衣壳基因的帮助质粒的比例。

## 方法

1. 用胰酶消化 15cm 板上汇合的 HEK 293 细胞（约 $2\times10^{7}$ 个）。按 1∶3 的比例用培养基稀释。重新接种并过夜。
2. 根据制造商的说明，用 Superfect 转染试剂盒，每块板（共 5～10 块）转染 7μg 的 pTR-CMV-GFP（转基因包装框）、15μg 的 pXX6-80（腺病毒帮助质粒）和 10μg 的

混合 AAV 血清型帮助质粒（pXR1-5）。

为了构建有不同血清型组分的 AAV 病毒颗粒，每种转染的 AAV 血清型帮助质粒的数量要根据估计的比例变化。例如，如果希望 AAV1 和 AAV2 按 19：1 的比例混合，则在转染混合物中要加入 9.5μg 的 pXR1 和 0.5μg 的 pXR2。

3. 以下的步骤可按方案 1 中的步骤 3～12 进行。

## 方案 3

# 通过标记拯救构建镶嵌型质粒

镶嵌型病毒颗粒含有由不同血清型衣壳蛋白之间交换结构域从而得到修饰的衣壳蛋白。构建镶嵌颗粒的方法主要包括标记拯救或对 AAV 颗粒进行突变，从而将一个到多个氨基酸大小的表面结构域进行交换。标记拯救方法（Bowles et al. 2003）利用 AAV 血清型之间的序列同源性作为由胞内蛋白质起始的重组交叉位点（图 2，见彩版）。对于重组的序列，可通过对包装进入颗粒的有功能的衣壳亚基进行定向筛选，从而使突变型颗粒中感染性表型或目标表型得到"拯救"。这种"前向构建"可作为构建镶嵌型颗粒的有效手段，可由筛选过程中确定的标准从而使这些镶嵌型颗粒具有独特的性质。

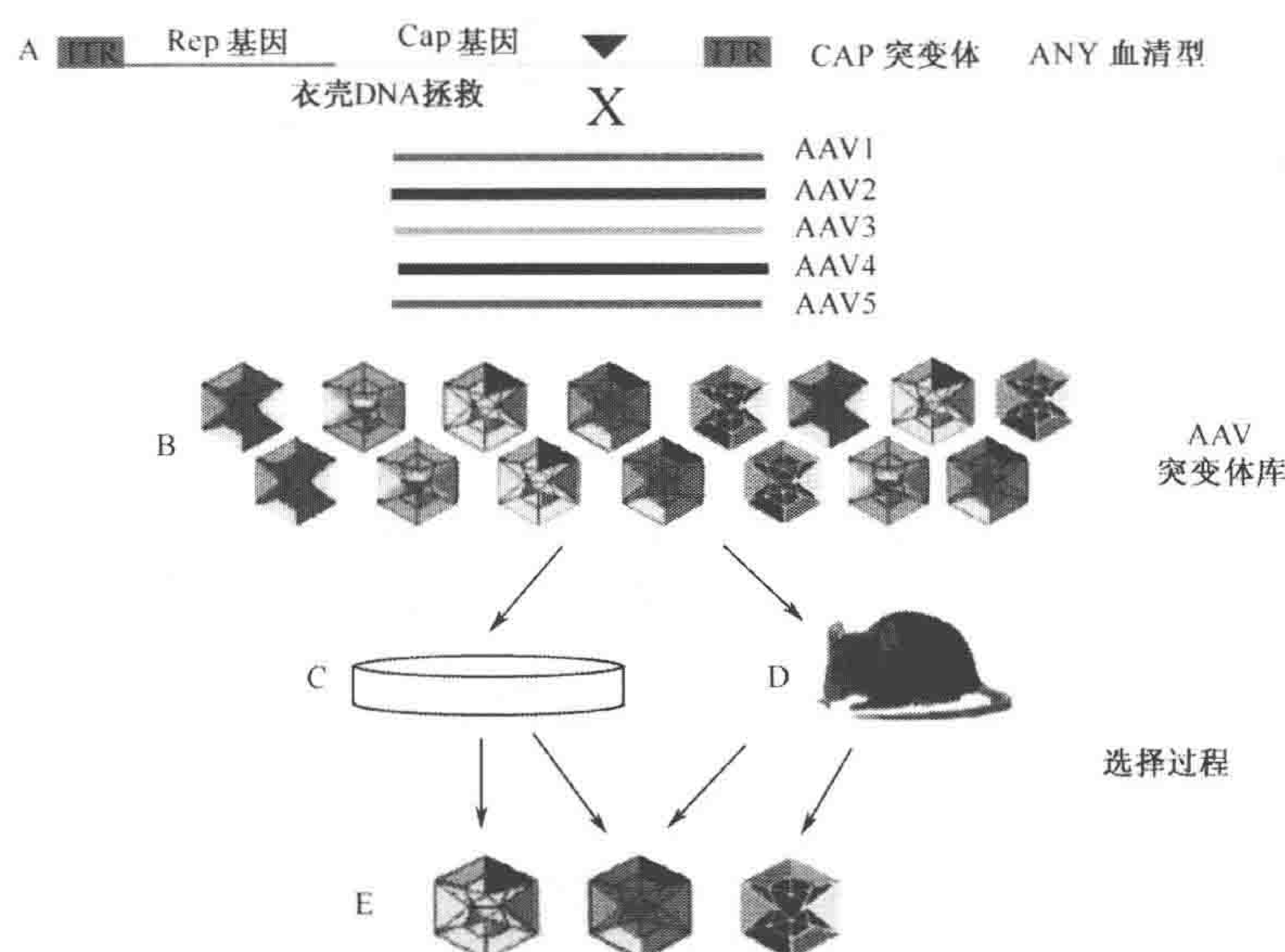



图 2. 构建镶嵌型 AAV 载体的标记拯救方法（方案 3）（Bowles et al. 2003）。A. 将任何一个血清型的衣壳突变体作为标记拯救质粒模板；突变体可以通过与作为模板的任何其他 AAV 血清型的衣壳 DNA 进行共转染得到拯救；B. 通过转染突变模板和衣壳 DNA 产生的病毒基因组文库形成了一个混合病毒基因组库，可以对这个库进行 PCR 扩增、克隆进穿梭载体，以及产生单克隆或克隆文库。这些可以（C）通过反复感染任何感兴趣的细胞系进行选择，或（D）在体内特定组织类型中进行选择，从而产生一种主要的镶嵌型 AAV 重组载体（E）。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Benzonase 核酸酶（Sigma-Aldrich）

细胞：HeLa 细胞（ATCC）或其他用于选择/循环的目标细胞类型和 HEK 293 细胞（ATCC）

氯化铯（Sigma-Aldrich）<!>

加有 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基（Sigma-Aldrich）<!>

亮肽素（leupeptin）（3μg/ml）（Sigma-Aldrich）<!>

磷酸盐缓冲液（PBS）（Sigma-Aldrich）

质粒

AAV 帮助穿梭质粒（如 pXR2AN）

这里所用的 pXR2AN 穿梭质粒在衣壳基因的起始处有一个单一的 *Afl*II 位点，在衣壳基因末端有一个单一的 *Not*I 位点。这样方便于将所有的 PCR 产物直接克隆到 AAV 帮助质粒上，从而进行测序和载体构建。

AAV 血清型帮助质粒（如 pXR1、pXR2、pXR3、pXR4 和 pXR5；UNC 载体核心）

腺病毒帮助质粒（如 pXX6-80；UNC 载体核心）

AAV 转基因包装框（如 pTR-CMV-GFP；UNC 载体核心）

有 Rep、Cap 和 ITR 区的 AAV 血清型质粒（UNC 载体核心）

所需的突变型 AAV 血清型质粒（如 H/N3761 无感染性的 AAV2 突变体）

用于扩增 AAV 血清型 Cap 蛋白 PCR 片段的引物（如 AAV3b）

Superfect 转染试剂盒（QIAGEN）

Trypsin-EDTA（Sigma-Aldrich）<!>

病毒：腺病毒 *dl*309（UNC 载体核心）<!>

### 仪器

构建镶嵌载体所需的材料和设备与方案 1 中的一样。

## 方法

1. 用 *Pvu*II 消化 H/N3761 AAV2 突变型质粒。
2. 将大约 $10^6$ 个 HEK 293 细胞均匀接种到 6cm 板上。
3. 根据制造商的说明，用 Superfect 转染试剂盒，用 1μg 经过消化的 H/N3761 AAV2 突变型质粒和 1μg AAV3b PCR 片段转染细胞。
4. 转染后，立即用 4 倍感染复数的腺病毒 *dl*309 转染 293 细胞。让病毒吸附 1h。

5. 用 5ml 新鲜培养基换掉含有病毒的培养基。
6. 转染后 48～60h 用细胞刮收获细胞。

除有特别规定外，所有以下的操作在冰上进行。

7. 1000r/min 离心细胞。(Sorvall RT 6000B)。
8. 用 PBS 重悬细胞，反复冻融 3 次使细胞释放病毒。
9. 将裂解液在 56℃孵育 30min，使腺病毒失活。
10. 将 100μl 裂解液加入到含有 4 倍感染复数腺病毒 *dl*309 的 HeLa 细胞中。

根据不同的研究需要，可以换用其他的细胞类型。

11. 重复步骤 5～10。
12. 每次循环后，对病毒感染的细胞裂解液进行斑点杂交，确认产生了能存活的细胞类型特异性镶嵌颗粒。
13. 用 PCR 分析来确定循环中得到的镶嵌颗粒的基因序列。
14. 为了测定重组型 AAV 的产量，按方案 1，用质粒 pTR-CMV-GFP、pXX6-80 和镶嵌型 AAV 帮助质粒进行三质粒转染。

## 参考文献


Bartlett J.S., Kleinschmidt J., Boucher R.C., and Samulski R.J. 1999. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific $F(ab'\gamma)_2$ antibody. *Nat. Biotechnol.* **17:** 181–186.

Blankinship M.J., Gregorevic P., Allen J.M., Harper S.Q., Harper H., Halbert C.L., Miller D.A., and Chamberlain J.S. 2004. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol. Ther.* **10:** 671–678.

Bowles D.E., Rabinowitz J.E., and Samulski R.J. 2003. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: A novel approach for chimeric AAV production. *J. Virol.* **77:** 423–432.

Buning H., Ried M.U., Perabo L., Gerner F.M., Huttner N.A., Enssle J., and Hallek M. 2003. Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* **10:** 1142–1151.

Burger C., Gorbatyuk O.S., Velardo M.J., Peden C.S., Williams P., Zolotukhin S., Reier P.J., Mandel R.J., and Muzyczka N. 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* **10:** 302–317.

Choi V.W., McCarty D.M., and Samulski R.J. 2005. AAV hybrid serotypes: Improved vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther.* **5:** 299–310.

Davidson B.L., Stein C.S., Heth J.A., Martins I., Kotin R.M., Derksen T.A., Zabner J., Ghodsi A., and Chiorini J.A. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 3428–3432.

Ding W., Zhang L., Yan Z., and Engelhardt J.F. 2005. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* **12:** 873–880.

Gigout L., Rebollo P., Clement N., Warrington K.H., Jr., Muzyczka N., Linden R.M., and Weber T. 2005. Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol. Ther.* **11:** 856–865.

Girod A., Ried M., Wobus C., Lahm H., Leike K., Kleinschmidt J., Deleage G., and Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2 (erratum *Nat. Med.* [1999] **5:** 1438). *Nat. Med.* **5:** 1052–1056.

Grifman M., Trepel M., Speece P., Gilbert L.B., Arap W., Pasqualini R., and Weitzman M.D. 2001. Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol. Ther.* **3:** 964–975.

Grimm D. and Kay M.A. 2003. From virus evolution to vector revolution: Use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **3:** 281–304.

Grimm D., Zhou S., Nakai H., Thomas C.E., Storm T.A., Fuess S., Matsushita T., Allen J., Surosky R., Lochrie M., Meuse L., McClelland A., Colosi P., and Kay M.A. 2003. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* **102:** 2412–2419.

Halbert C.L., Allen J.M., and Miller A.D. 2001. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J. Virol.* **75:** 6615–6624.

Kern A., Schmidt K., Leder C., Muller O.J., Wobus C.E., Bettinger K., Von der Lieth C.W., King J.A., and Kleinschmidt J.A. 2003. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J. Virol.* **77:** 11072–11081.

Loiler S.A., Tang Q., Clarke T., Campbell-Thompson M.L., Chiodo V., Hauswirth W., Cruz P., Perret-Gentil M., Atkinson M.A., Ramiya V.K., and Flotte T.R. 2005. Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Mol. Ther.* **12:** 519–527.

Loiler S.A., Conlon T.J., Song S., Tang Q., Warrington K.H., Agarwal A., Kapturczak M., Li C., Ricordi C., Atkinson M.A., Muzyczka N., and Flotte T.R. 2003. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* **10:** 1551–1158.

Lotery A.J., Yang G.S., Mullins R.F., Russell S.R., Schmidt M., Stone E.M., Lindbloom J.D., Chiorini J.A., Kotin R.M., and Davidson B.L. 2003. Adeno-associated virus type 5: Transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum. Gene Ther.* **14:** 1663–1671.

Louboutin J.P., Wang L., and Wilson J.M. 2005. Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J. Gene Med.* **7:** 442–451.

Maheshri N., Koerber J.T., Kaspar B.K., and Schaffer D.V. 2006. Directed evolution of adenoassociated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat. Biotechnol.* **24:** 198–204.

Muller O.J., Kaul F., Weitzman M.D., Pasqualini R., Arap W., Kleinschmidt J.A., and Trepel M. 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat. Biotechnol.* **21:** 1040–1046.

Muzyczka N. and Warrington K.H., Jr. 2005. Custom adeno-associated virus capsids: The next generation of recombinant vectors with novel tropism. *Hum. Gene Ther.* **16:** 408–416.

Nicklin S.A. and Baker A.H. 2002. Tropism-modified adenoviral and adenoassociated viral vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2:** 273–293.

Nicklin S.A., Buening H., Dishart K.L., de Alwis M., Girod A., Hacker U., Thrasher A.J., Ali R.R., Hallek M., and Baker A.H. 2001. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol. Ther.* **4:** 174–181.

Opie S.R., Warrington K.H., Jr., Agbandje-McKenna M., Zolotukhin S., and Muzyczka N. 2003. Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J. Virol.* **77:** 6995–7006.

Padron E., Bowman V., Kaludov N., Govindasamy L., Levy H., Nick P., McKenna R., Muzyczka N., Chiorini J.A., Baker T.S., and Agbandje-McKenna M. 2005. Structure of adeno-associated virus type 4. *J. Virol.* **79:** 5047–5058.

Peden C.S., Berger C., Muzyczka N., and Mandel R.J. 2004. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J. Virol.* **78:** 6344–6359.

Perabo L., Endell J., King S., Lux K., Goldnau D., Hallek M., and Buning H. 2005. Combinatorial engineering of a gene therapy vector: Directed evolution of adeno-associated virus. *J. Gene Med.* **8:** 155–162.

Perabo L., Buning H., Kofler D.M., Ried M.U., Girod A., Wendtner C.M., Enssle J., and Hallek M. 2003. In vitro selection of viral vectors with modified tropism: The adeno-associated virus display. *Mol. Ther.* **8:** 151–157.

Ponnazhagan S., Mahendra G., Kumar S., Thompson J.A., and Castillas M., Jr. 2002. Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J. Virol.* **76:** 12900–12907.

Rabinowitz J.E., Xiao W., and Samulski R.J. 1999. Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* **265:** 274–285.

Rabinowitz J.E., Bowles D.E., Faust S.M., Ledford J.G., Cunningham S.E., and Samulski R.J. 2004. Cross-dressing the virion: The transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J. Virol.* **78:** 4421–4432.

Rabinowitz J.E., Rolling F., Li C., Conrath H., Xiao W., Xiao X., and Samulski R.J. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* **76:** 791–801.

Ried M.U., Girod A., Leike K., Buning H., and Hallek M. 2002. Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J. Virol.* **76:** 4559–4566.

Rose J.A., Maizel J.V., Jr., Inman J.K., and Shatkin A.J. 1971. Structural proteins of adeno-associated viruses. *J. Virol.* **8:** 766–770.

Shi W., Arnold G.S., and Bartlett J.S. 2001. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum. Gene Ther.* **12:** 1697–1711.

Summerford C. and Samulski R.J. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* **72:** 1438–1445.

Takeda S., Takahashi M., Mizukami H., Kobayashi E., Takeuchi K., Hakamata Y., Kaneko T., Yamamoto H., Ito C., Ozawa K., Ishibashi K., Matsuzaki T., Takata K., Asano Y., and Kusano E. 2004. Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: Comparison among adeno-associated virus serotype 1–5 vectors in vitro and in vivo. *Nephron Exp. Nephrol.* **96:** e119–e126.

Thomas C.E., Storm T.A., Huang Z., and Kay M.A. 2004. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **78:** 3110–3122.

Urabe M., Ding C., and Kotin R.M. 2002. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* **13:** 1935–1943.

Walters R.W., Agbandje-McKenna M., Bowman V.D., Moninger T.O., Olson N.H., Seiler M., Chiorini J.A., Baker T.S., and Zabner J. 2004. Structure of adeno-associated virus serotype 5. *J. Virol.* **78:** 3361–3371.

Wang L., Peng P.D., Erhardt A., Storm T.A., and Kay M.A. 2004. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* **15:** 405–413.

Wang Z., Zhu T., Qiao C., Zhou L., Wang B., Zhang J., Chen C., Li J., and Xiao X. 2005. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* **23:** 321–328.

Warrington K.H., Jr., Gorbatyuk O.S., Harrison J.K., Opie S.R., Zolotukhin S., and Muzyczka N. 2004. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J. Virol.* **78:** 6595–6609.

Weber M., Rabinowitz J., Provost N., Conrath H., Folliot S., Briot D., Cherel Y., Chenuaud P., Samulski R.J., Moullier P., and Rolling F. 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol. Ther.* **7:** 774–781.

White S.J., Nicklin S.A., Buning H., Brosnan M.J., Leike K., Papadakis E.D., Hallek M., and Baker A.H. 2004. Targeted gene delivery to vascular tissue in vivo by tropism-modified adeno-associated virus vectors. *Circulation* **109:** 513–519.

Work L.M., Nicklin S.A., Brain N.J., Dishart K.L., Von Seggern D.J., Hallek M., Buning H., and Baker A.H. 2004. Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther.* **9:** 198–208.

Wu P., Xiao W., Conlon T., Hughes J., Agbandje-McKenna M., Ferkol, Flotte T., and Muzyczka N. 2000. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J. Virol.* **74:** 8635–8647.

Xiao W., Chirmule N., Berta S.C., McCullough B., Gao G., and Wilson J.M. 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J. Virol.* **73:** 3994–4003.

Xiao X., Li J., and Samulski R.J. 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72:** 2224–2232.

Xie Q., Bu W., Bhatia S., Hare J., Somasundaram T., Azzi A., and Chapman M.S. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 10405–10410.

Yang Q., Mamounas M., Yu G., Kennedy S., Leaker B., Merson J., Wong-Staal F., Yu M., and Barber J.R. 1998. Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **9:** 1929–1937.

Zabner J., Seiler M., Walters R., Kotin R.M., Fulgeras W., Davidson B.L., and Chiorini J.A. 2000. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J. Virol.* **74:** 3852–3858.

# 第二十章　重组的单纯疱疹病毒载体

William F. Goins, David M. Krisky, James B. Wechuck,
Darren Wolfe, Shaohua Huang 和 Joseph C. Glorioso
Department of Molecular Genetics and Biochemistry, University of Pittsburgh School of Medicine, E1240 Biomedical Sciences Tower, Pittsburgh, Pennsylvania 15261

付超和叶文彬　译



## 摘要

对导致特定疾病的基因产物进行确定和分析，使得利用转基因载体进行基因替换可能成为一种新的治疗方法。构建有效的载体对于治疗性基因产物在体内高效地运输和表达具有重要作用。病毒已被改造成转基因载体，能高效地将核酸运输至细胞并保持其自然特性。其中，单纯疱疹病毒 1 类（HSV-1）是对外围和中枢神经系统进行转基因的很好的选择。HSV-1 的自然生理特点包括在神经元中建立一种终生潜伏状态，病毒基因始终是一种游离性分子。已构建了能产生完全不能复制的、无毒性的、能长期表达转基因的 HSV 载体，也构建了能在特定细胞（如癌细胞）中保持复制能力的可复制重组型基因 HSV 载体，并被利用到多形性胶质母细胞瘤患者临床试验的 I 期和 II 期。最近的研究集中在将 HSV 载体用于治疗非神经系统疾病。生产用于潜伏期效能和安全测试的 HSV 载体的大规模系统也得到了发展。本章介绍了重组 HSV 载体的构建和如何将它们用于对各种细胞类型的转导。

## 引言

### HSV 转基因载体

HSV-1 有许多生物学特性使得它有利于对神经系统进行基因传送（Wolfe et al. 1999; Burton et al. 2001; Fink et al. 2003; Goins et al. 2004）。自然感染时，病毒在神经元中建立潜伏状态，使病毒基因组能够在宿主细胞核内以游离元件的形式终生存在。潜伏基因组能在三叉神经中枢中终生存在，而不引起感觉的丧失或中枢的损害，证

明了这些自然潜伏机制的有效性。尽管在许多压力的影响下，野生型的病毒可能从潜伏状态被激活，不过能构建完全缺失复制能力的病毒，它们能在神经元中保持基因组长期潜伏，而不能复制或在神经系统中重新被活化。这些持久的基因组不进行溶解相关基因的表达，却保持有表达潜伏相关转录体的能力。

## HSV 的生命周期

HSV-1 是一个含有能编码多于 80 个基因产物的 152kb 线性双链 DNA 的大的亲神经源性人类病毒。病毒基因组由两个片段组成（图 1，见彩版）：独特性长片段（UL）和独特性短片段（US）。每个都侧连反向重复序列，并包含有重要的即早期（IE）转录调控基因和潜伏相关转录单位。除少数例外，病毒基因组是个连续的转录单元，这使得对它们进行基因操作变得直观。病毒颗粒由一个被被膜包裹的核衣壳组成，被膜中含有对病毒吸附和穿透有重要作用的糖蛋白。在衣壳和被膜之间，是被称作外壳的蛋白质基质。外壳含有许多结构蛋白，包括 VP16。VP16 能与胞内转录因子协调，激活 HSV IE 基因的启动子和 UL41 病毒基因产物，后者能关闭宿主蛋白质的合成。

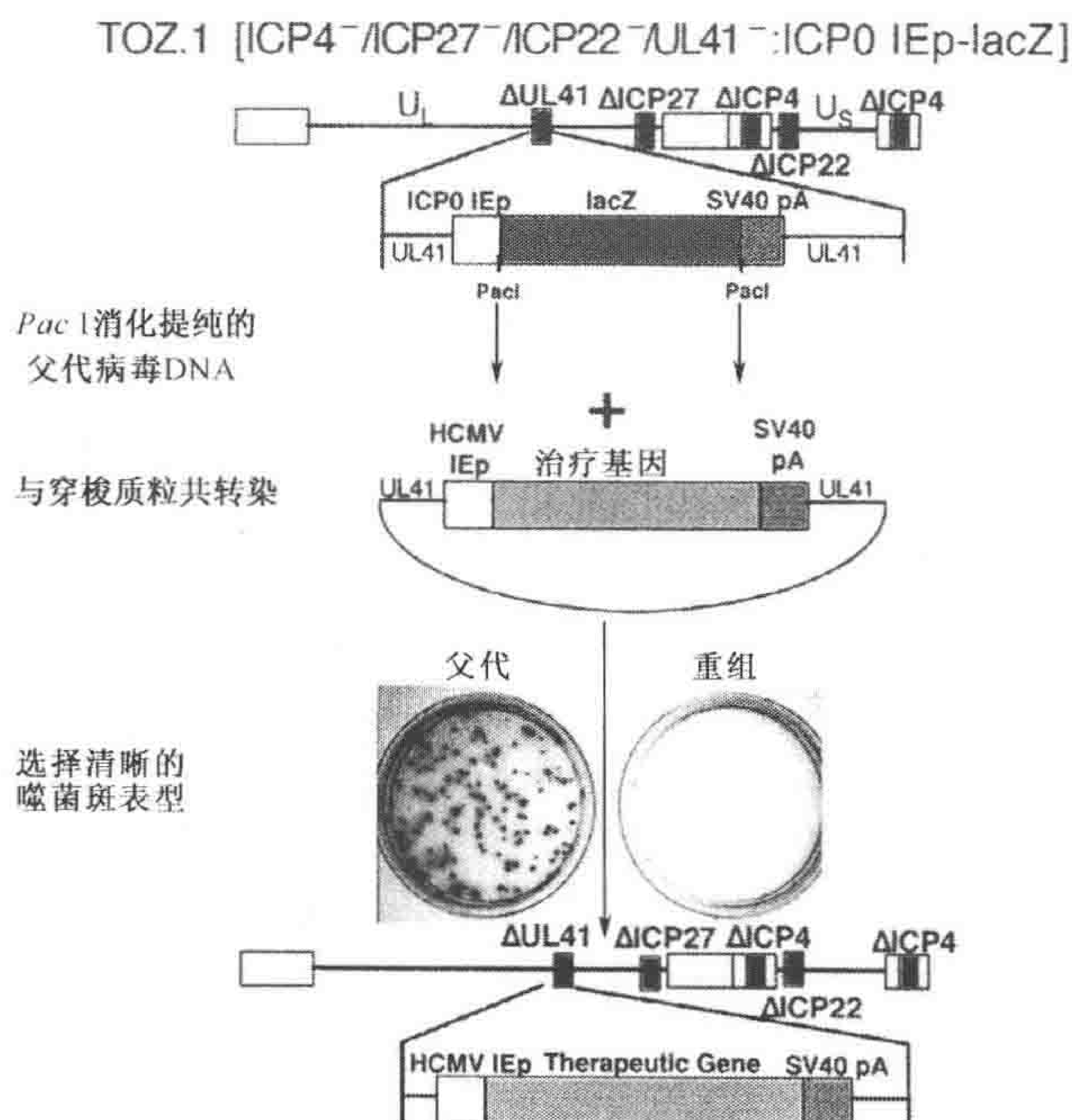



图 1. 将目的治疗基因重组进入复制缺陷型的 HSV-1 载体。复制缺陷型的 HSV-1 载体 TOZ.1 删除了 ICP4、ICP27 和 ICP22 基因，并含有一个 ICP0 启动子下的 *lacZ* 表达框，其中有单一的 *Pac*I 限制酶位点。为了使目的治疗基因通过同源重组进入 TOZ.1 载体，用 *Pac*I 限制酶消化经纯化的 TOZ.1 DNA，将这段 DNA 与含有目的治疗基因的 UL41 转移质粒一起转染 7b 细胞。如果发生了同源重组，目的基因会替换掉 *lacZ* 基因。在限制性稀释分析中，可通过产生的白色菌斑筛选阳性重组体，与之相比，父代载体产生蓝色菌斑。

病毒首先在皮肤的上皮细胞或黏膜中复制。后代病毒占据了感觉神经末梢，被逆向

轴突运输到外围神经细胞体。病毒 DNA 通过修饰的衣壳亚单位被注射到核内。这时，可能会发生两种不同的病毒生命周期。

1. 病毒可能进入溶解复制周期，在这个过程中，病毒 IE 基因的表达反式激活早期（E）基因的表达。这些基因产物是 DNA 复制复合体的主要组分。IE 基因的表达不需要病毒基因的表达，而是被 HSV 外壳蛋白 VP16 激活。E 基因的表达导致后代基因组连接体的产生。在病毒 DNA 合成和 IE 基因产物转录和转录后调控进行后，晚期（L）基因被转录。L 基因主要编码结构蛋白，这些蛋白质是病毒颗粒在核内的组装、从核膜被修饰的部分出芽、转运到细胞表面并离开细胞所需的。
2. 相反，病毒可能进入潜伏期，溶解感染相关的基因产物或是不被转录，或是被永远沉默掉了。

这些特性无论对于能复制（如癌性的）或不能复制的载体都是成立的，除了不能复制的载体通过删除一个或几个重要的 HSV 基因产物而失去了复制的能力外。本章介绍了复制缺陷型 HSV 载体的构建和利用。实际上，这些技术中许多都能应用于两种载体系统，除了能复制的载体不需要生长和增殖所需的辅助细胞系外。

## 复制缺陷的 HSV 载体

在溶解性感染中，HSV 基因以连续的、相互依赖的方式表达。因此，删除重要的 IE 基因 ICP4 会阻碍后面基因的表达（Deluca and Schaffer 1985），导致一个不能产生能表达 E 或 L 基因的病毒颗粒的载体。然而，剩下的 IE 基因能继续表达，除 ICP47 以外，对培养的细胞都有毒性。因此，只有将大多数的 IE 基因删除才能减少以 HSV 为基础的载体对组织培养细胞的毒性。相反，删除的病毒基因的数量并不影响体内感染神经元时载体相关的毒性。在低于 10 的感染复数下，删除 ICP4 的载体骨架（删除更多病毒基因的突变体也是如此）能被用来在许多细胞中无毒性地高水平表达转基因，尤其是在外围神经系统神经元和体内（Krisky et al. 1998b）。这些复制缺陷的突变体能在神经元和其他细胞类型中持久存在，这使得这些载体成为表达治疗性基因的理想载体骨架。

已经发展了许多方法来构建复制缺陷型 HSV 骨架载体，并对确定基因转染的效率、特定载体在没有载体相关毒性的同时持续表达报道基因或治疗基因产物的能力做了许多研究。现有的方法都利用同源重组来删除 HSV-1 IE 基因功能并将外源基因转入 HSV-1 基因组中（Krisky et al. 1997）。因为一些 HSV-1 IE 基因（如 ICP4 和 ICP27）是病毒在细胞中生长所需的，因此反式表达这些基因产物的辅助细胞系是这些复制缺陷型病毒突变体分离和增殖所必需的。

第一代 复制缺陷型病毒被删掉了一个重要基因，或是 ICP4，或是 ICP27。ICP4 缺陷的重组体能在一种辅助细胞系中生长，这种细胞在感染了无 ICP4 的病毒突变体后能反式表达 ICP4（DeLuca et al. 1985）。将以 ICP0 IE 基因为启动子的 β-半乳糖苷酶（*lacZ*）报道框导入这些复制缺陷突变体基因组的 UL41 基因座中，就形成了 SOZ 载体（Krisky et al. 1997），它能在许多培养细胞和体内组织细胞中表达转基因。

第二代 复制缺陷型基因许多 IE 重要基因功能如 ICP4 和 ICP27 被删除。为了增殖这种突变体，必须构建能补充 ICP4 和 ICP27 的辅助细胞系。可通过向 Vero 细胞转染

一个含有能编码 ICP4 和 ICP27 的 HSV-1 序列和用于克隆选择的新霉素表达框和质粒来达到目的（Marconi et al. 1996）。构建含有 ICP4 和 ICP27 编码框的质粒必须避免这些序列与病毒上剩余的删除重叠，从而消除同源重组的可能，并当病毒突变体在辅助细胞系中增殖时拯救它。7b 细胞系（Marconi et al. 1985）能辅助删除 ICP4 或 ICP27 基因的 IE 突变体的生长。

因为只删除两个 IE 基因不能明显降低毒性，又构建了删除 ICP4、ICP27 和 ICP22 的第三代重组载体。重组的 TOZ.1 载体是通过将 SOZ.1 载体与缺失了 ICP4、ICP27 和 ICP22 的 T.1 载体进行病毒基因杂交得到的。阳性重组载体（$lacZ^+$）能在 7b 辅助细胞系中增殖和分离，而 $lacZ^+$ 病毒只能在表达 ICP4 的细胞中形成斑点（如亲代 SOZ.1)。新的 HSV 载体可以 TOZ.1 为骨架，通过同源重组将含有目的表达框的质粒插入到 UL41 基因序列中进行构建。TOZ.1 载体在 UL41 基因座表达报道基因（*lacZ*)，因此将转基因框导入 UL41 基因座导致报道基因活性的缺失。TOZ.1 载体还含有单一的 *Pac*I 限制酶位点，以便于亲代病毒 DNA 的酶切，从而减少非重组背景噪声。在大多数情况下，利用这种技术，代表重组体的噬菌斑比例能上升至 10%～50%。将穿梭质粒同源重组到 *Pac*I 酶切的 TOZ.1 基因组后，可通过白色斑点筛选出新的重组体。通过三轮限制性稀释分析、Southern 印迹或聚合酶链反应（PCR）分析来确定重组体的结构。

# 方案

## 可复制和复制缺陷型 HSV 载体的构建

### 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

细胞：标准 Vero 非洲青猴肾细胞的 7b 变种（Marconi et al. 1996)，Vero 细胞（ATCC：CCL81)，或其他辅助细胞系

　这些细胞是 HSV-1 可复制或复制缺陷型病毒增殖所需的。

结晶紫溶液（1%溶解于甲醇：$dH_2O$，50：50，*V/V*）＜！＞

DMEM/10%胎牛血清（FBS)

　补充了非必需氨基酸的 DMEM 培养基

　100 U/ml 青霉素 G＜！＞

　100μg/ml 硫酸链霉素＜！＞

　2mmol/L 谷氨酰胺

　10%FBS

乙醇（70%）

甘油

HEPES（1mol/L，pH 7.35)

碘克沙醇（60%；Invitrogen）

使用前，将60%的碘克沙醇用PBS稀释至最终浓度为20%。

异丙醇<!>

Lipofectamine 2000（Invitrogen）

裂解缓冲液（100mmol/L Tris-HCl<!> pH 8.0 和 10mmol/L EDTA）

甲基纤维素覆盖（1.0%）

在附有搅拌棍的500ml消毒瓶中，将25μg甲基纤维素加入100ml pH 7.5 的PBS溶液中，在液流中对瓶子进行高压处理（45min）。溶液冷却后，加入350ml含有非必需氨基酸、100U/ml青霉素G、100μg/ml硫酸链霉素和2mmol/L谷氨酰胺的DMEM。充分混匀，将瓶子放在搅拌器上4℃过夜。当甲基纤维素溶解后，加入50ml FBS。

*Pac*I 限制性内切核酸酶（New England BioLabs）

PBS（pH 7.5）

135mmol/L NaCl

2.5mmol/L KCl<!>

1.5mmol/L $KH_2PO_4$<!>

8.0mmol/L $Na_2HPO_4$<!>

质粒

转染质粒 pUL41（Krisky et al. 1997）

含有兴趣基因的质粒

蛋白酶K（Boehringer Mannheim）<!>

Tris 盐缓冲液（TBS）（pH 7.5）[50mmol/L Tris-HCl（pH 7.5），150mmol/L NaCl 和 1mmol/L EDTA]

TE [10mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）和 1mmol/L EDTA]

TE 平衡的苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1，*V/V/V*）<!>

病毒：TOZ.1 病毒（Krisky et al. 1997，1998b）

X-gal 显色溶液

300μg X-gal/ml TBS<!>

14mmol/L $K_4Fe(CN)_6$<!>

14mmol/L $K_3Fe(CN)_6$<!>

X-gal 难溶于水，必须先溶解于二甲基甲酰胺<!>，然后再加入显色溶液中。

## 仪器

细胞刮刀

离心瓶（500ml 聚丙烯）

$CO_2$ 培养箱

Cup-horn 超声波破碎仪

保温瓶（T-75$cm^2$）

排枪

Nutator 旋转台

Phase Lock Gel Heavy 管（Eppendorf）
培养板（6孔、12孔和96孔板）
带 JLA 10.5 转头的预备式离心机（Beckman）
滚瓶（850cm$^2$）
带针头的注射器（3ml）
管子：
  13ml Beckman 17mm path-length seal
  15ml 锥形瓶
带 NVT65 转头的超速离心机（Beckman XL-90）
宽口枪头

## 方法

### 转染所需病毒 DNA 的分离

病毒 DNA 的质量决定了所需的重组病毒产生的频率。下面列出的最优方法能产生高感染力的病毒 DNA；1μg 纯化的病毒 DNA 能产生 100～1000 个噬菌斑。由这个方法产生的 DNA 含有细胞 DNA 和病毒 DNA。细胞 DNA 在沉淀过程中可起到载体的作用，提高产量。细胞 DNA 在转染时也能起到载体的作用，提高沉淀形成的整体效率，从而提高得到所需重组体的机会。需要的话，能通过从被感染细胞的培养基中获得的病毒或梯度纯化得到的病毒颗粒中，得到纯的病毒 DNA。然而，通过这些方法得到的 DNA 产量大大降低。

1. 将 $2.4\times10^7$ pfu 的 TOZ.1 病毒加入到约 $8\times10^6$ 个辅助 7b 细胞中（感染复数＝3）。37℃旋转培养 1h。
2. 将感染的细胞转入 T-75 瓶中。在 37℃ $CO_2$ 培养箱中培养 18～24h。

   所有的细胞都应被病毒感染，并吸附在瓶上。
3. 用细胞刮刮下细胞。转入 15ml 的锥形管中。
4. 4℃，2060$g$ 离心 10min。除去上清。
5. 将 1ml 加有 0.1mg/ml 蛋白酶 K 的裂解缓冲液加入到管中。
6. 将管子置于 Nutator 旋转台上，37℃旋转过夜。
7. 将溶液转入 Phase Lock Gel Heavy 管。
8. 加入 1ml 的苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）。轻轻混匀 1～2min。
9. 3020$g$ 离心 5min。
10. 将水相转到新管子中。
11. 加入 2 倍体积异丙醇。充分混匀。
12. 用玻璃枪头将沉淀的 DNA（白色絮状）绕在上面。
13. 将缭绕的 DNA 转到新管子中。用 70％乙醇清洗。让 DNA 在空气中风干。
14. 在干燥的管中加入 0.5ml TE 缓冲液。25℃孵育过夜。
15. 用宽口枪头轻轻吹打，使 DNA 重悬。

用宽口枪头（Gilson）能最大限度减少病毒 DNA 的断裂，从而提高病毒 DNA 的感染力。

16. 用分光光度计测定 DNA 浓度（$OD_{260}$）。

## 重组病毒的构建

将要插入病毒中的兴趣基因首先必须克隆到含有至少 500～1000bp 侧翼 HSV-1 序列的转染质粒（pUL41）中。HSV-1 基因被删除（在这指 UL41），同时保留足够的 HSV-1 侧翼序列以保证有效的重组到病毒基因组上。然后，就可能将这些序列重组至病毒的 UL41 基因座上。这是通过将线性质粒和 *Pac*I 酶切的纯化病毒 DNA 共转入到 7b 细胞中而实现的。为了检测含有兴趣基因的重组体，目标亲代病毒骨架中应该在所需的重组位点上（UL41）有个报道基因框（TOZ.1 的 *lacZ*）。转染所得的阳性重组体应该产生白色斑块，而亲代病毒产生蓝色斑块。

17. 将兴趣基因克隆到 UL41 穿梭质粒中。
18. 转染前一天，将 $5\times10^5$ 个 7b 细胞种到含有 DMEM/10%FBS 的 6 孔板中。
19. 根据制造商的方法，37℃下，用 *Pac*I 酶切病毒 DNA（由步骤 15 得到）6h。
20. 根据制造商的方法，用 Lipofectamine 2000 将病毒 DNA 和质粒 DNA 转入细胞。

    质粒载体在转染前应线性化，与未经酶切的超螺旋质粒相比，能提高重组的效率。对质粒进行酶切，将插入片段释放出来，并纯化限制性酶切片段，并不能提高重组效率。然而，推荐使用纯化的片段，因为这减少了由于半同源重组将质粒载体序列插入病毒中的可能性。

21. 加入新鲜的 DMEM/10%FBS，37℃培养。

    根据不同的病毒，在 3～5d 内形成菌斑。

22. 形成菌斑后，收获培养基和细胞。
23. 将细胞反复冻融 3 次。超声波破碎细胞。
24. 4℃，2060*g* 离心 5min 以除去细胞碎片。将上清与从以前得到的培养基（步骤 22）混合。

    将上清于－80℃保存放置。

25. 确定储存的重组病毒的滴度。
    a. 用无血清的培养基将病毒进行一系列的 10 倍稀释（$10^{-2}$～$10^{-10}$）。
    b. 将每个稀释倍数的病毒加 100μl 到含有 $4\times10^5$ 个 7b 细胞/孔的 12 孔板中。
    c. 37℃下，将平板在 $CO_2$ 培养箱中孵育 1h。加入 1ml 的 DMEM/10%FBS，培养箱中过夜。
    d. 接下来的 24h 内，除去培养基。在单层细胞上覆盖 1ml 的 1%甲基纤维素/10% FBS 溶液。
    e. 将平板孵育 3～5d 直到形成菌斑。
    f. 拿出甲基纤维基膜，用结晶紫溶液染色 5min。
    g. 进行斑点计数并计算原来的 pfu/1ml 的数量。
26. 将30 pfu 的病毒加入置于 15ml 锥形管中的个数约为 $2\times10^6$ 的 1ml 悬浮细胞中。

    37℃下，将管子放置于 Nutator 旋转台上 1.5h。

27. 加入 9ml 的新鲜培养基。在 96 孔板每孔接种 100μl。
28. 37℃下，将平板在 $CO_2$ 培养箱中孵育 3～5d，直到形成菌斑。

29. 用 X-gal 染色来确定哪些样品含有所需的重组病毒所形成的菌斑。

如果发生了重组，兴趣基因会替换 *lacZ* 报道基因。

a. 将培养基从 96 孔板转移到新的 96 孔板中。

将这块平板在－80℃保存，以备下一轮限制性稀释所用。

b. 在有转染细胞的 96 孔板中，每个孔加入 100μl 的 X-gal 染色溶液。

c. 将平板在 37℃培养 1～18h，直到形成蓝色斑块。

d. 确定只含有一个白色斑块的孔。

如果病毒重组体中的兴趣基因取代了 TOZ.1 中的 *lacZ*，就会形成白色斑块。

30. 用保存在－80℃的病毒再进行两轮限制性稀释斑点分离（步骤 26～29）。

31. 分离病毒 DNA，用 Southern 印迹确定存在插入基因和缺失被删除基因（步骤 29a）。

在这一步，保存的病毒可以用来制备一般实验所需的高滴度储存液。

## 病毒储存液的制备和纯化

下列步骤是用两个滚瓶的细胞准备的病毒储存液。请根据需要调整规模。

32. 在两个 850cm$^2$ 滚瓶中，每个加入 100ml 含约 $2\times10^7$ 个辅助细胞的 DMEM/10% FBS 培养基。37℃孵育。

如果不在 $CO_2$ 培养箱中孵育，就在每个瓶中加入 1.7ml 的 HEPES（pH 7.35）来对培养基进行缓冲。

33. 当细胞单层达到大约 75%汇合度时（2～3d），吸去培养基。加入 10ml 含感染倍数为 0.02～0.05 病毒的无血清 DMEM。在 37℃孵育 1.5h。

34. 在吸收阶段的末期，加入 90ml 含有 1ml HEPES 的 DMEM/10%FBS。在 37℃孵育 2～3d。

用光学显微镜观察瓶子，确定收获病毒的最优时间。时间根据不同的病毒骨架而变化。一般来说，当大部分细胞发生卷曲，但还未从瓶子表面脱落时，病毒的细胞毒性就很明显了。

35. 用细胞刮刀将细胞刮入培养基。

36. 收获含有悬浮细胞的培养基。4℃，2060 *g* 离心 10min。

37. 将上清移到 500ml 聚丙烯离心瓶中。冰上放置。

38. 用最少体积（2～5ml）的无血清 DMED 重悬细胞。用三轮超声波破碎来释放细胞相关病毒。

39. 4℃，2060 *g* 离心 10min。移出上清。与步骤 37 中所得的上清混合。冰上放置。

40. 用带 JLA 10.5 转头的 Beckman 预备式离心机，将混合上清 18 600 *g* 离心 1h。

41. 弃上清。每个含有病毒感染细胞的滚瓶中加入 500μl PBS，充分振荡使病毒重悬。

42. 将上清转移到 13ml Beckman 17mm path-length 封闭管中。加 20%碘克沙醇直到总体积为 13ml。封闭管子。

43. 用带 NVT65 转头的 Beckman XL-90 超速离心机，342 000 *g* 离心 4.5h。

44. 用 3ml 注射器的针头插入封闭管，吸出 1～1.5ml 的病毒（上部）带（图 2）。

几乎 60%的病毒都会出现在从梯度底部起的第二条带上。有时用野生型制备时，可能会出现一条较高的缺陷性带。如果有三条带，取中间的一条。另外，可对管子进行分馏并确定

每个馏分的滴度。

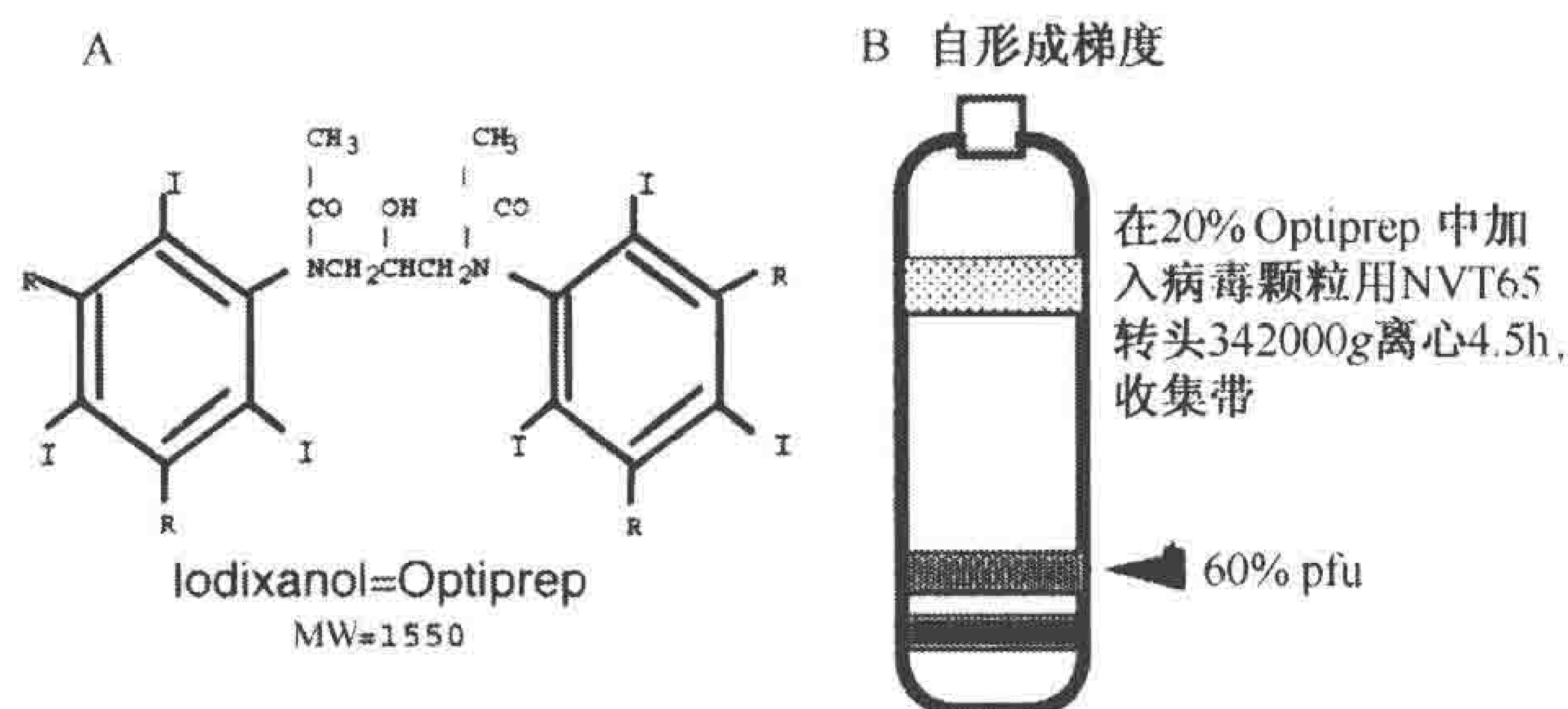



图 2. Optiprep 自形成梯度和 HSV-1 载体的纯化。A. Optiprep［碘克沙醇（iodixanol）］的化学结构。B. 在收获病毒颗粒时，自形成的 Optiprep 梯度和梯度中 HSV 颗粒的位置。

45. 整数倍稀释病毒并测定滴度。−80℃保存病毒。Optiprep 可被用作防冻剂。

3～5 的低感染复数就足够转导 100%的细胞，而不像其他病毒，如腺病毒、AAV、标准逆转录病毒和慢病毒。可通过不同剂量的直接注射将病毒转导至体内。

## 疑难解答

问题：病毒滴度太低。

解决方法：可通过 4℃，2060*g* 离心 10min 使病毒更浓缩。离心后，用最小体积的 PBS 重悬病毒，PBS 中含有最终浓度为 10%的甘油用作防冻剂。

问题：在缺失掉重要基因的病毒的增殖过程中，野生型的病毒被拯救。

解决方法：病毒储存液需通过少量的传代维持。用一管新准备的储存液来制备新的储存液。一般用单个分离的斑块来制备储存液。

### 参 考 文 献

Burton E.A., Wechuck J.B., Wendell S.K., Goins W.F., Fink D.J., and Glorioso J.C. 2001. Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors. *Stem Cells* **19:** 358–377.

DeLuca N.A. and Schaffer P.A. 1985. Activation of immediate-early, early, and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol. Cell. Biol.* **5:** 1997–2008.

DeLuca N.A., McCarthy A.M., and Schaffer P.A. 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **56:** 558–570.

Fink D.J., Glorioso J., and Mata M. 2003. Therapeutic gene transfer with herpes-based vectors: Studies in Parkinson's disease and motor nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **184:** S19–24.

Goins W.F., Wolfe D., Krisky D.M., Bai Q., Burton E.A., Fink D.J., and Glorioso J.C. 2004. Delivery using herpes simplex virus: An overview. *Methods Mol. Biol.* **246:** 257–299.

Honess R. and Roizman B. 1974. Regulation of herpes simplex virus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14:** 8–19.

Johnson P., Wang M., and Friedmann T. 1994. Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function. *J. Virol.* **68:** 6347–6362.

Johnson P., Miyanohara A., Levine F., Cahill T., and Friedmann T. 1992. Cytotoxicity of a replication-defective mutant herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **66:** 2952–2965.

Krisky D., Marconi P., Oligino T., Rouse R., Fink D., and Glorioso J. 1997. Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene Ther.* **4:** 1120–1125.

Krisky D.M., Marconi P.C., Oligino T.J., Rouse R.J., Fink D.J., Cohen J.B., Watkins S.C., and Glorioso J.C. 1998a. Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Ther.* **5:** 1517–1530.

Krisky D.M., Wolfe D., Goins W.F., Marconi P.C., Ramakrishnan R., Mata M., Rouse R.J., Fink D.J., and Glorioso J.C. 1998b. Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Ther.* **5:** 1593–1603.

Mackem S. and Roizman B. 1982. Structural features of the herpes simplex virus α gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer α regulation on chimeric thymidine kinase. *J. Virol.* **44:** 939–949.

Marconi P., Krisky D., Oligino T., Poliani P.L., Ramakrishnan R., Goins W.F., Fink D.J., and Glorioso J.C. 1996. Replication-defective HSV vectors for gene transfer in vivo. *Proc. Natl.*

*Acad. Sci.* **93:** 11319–11320.

McCarthy A.M., McMahan L., and Schaffer P.A. 1989. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J. Virol.* **63:** 18–27.

Moriuchi S., Krisky D.M., Marconi P.C., Tamura M., Shimizu K., Yoshimine T., Cohen J.B., and Glorioso J.C. 2000. HSV vector cytotoxicity is inversely correlated with effective TK/GCV suicide gene therapy of rat gliosarcoma. *Gene Ther.* **7:** 1483–1490.

Oroskar A. and Read G. 1989. Control of mRNA stability by the virion host shutoff function of herpes simplex virus. *J. Virol.* **63:** 1897–1906.

Roizman B. and Knipe D.M. 2001. Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields virology*, 4th edition (ed. D.M. Knipe and P.M. Howley), pp. 2399–2459. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.

Samaniego L., Naxin W., and DeLuca N. 1997. The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27. *J. Virol.* **71:** 4614–4625.

Samaniego L., Webb A., and DeLuca N. 1995. Functional interaction between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: Gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. *J. Virol.* **69:** 5705–5715.

Wolfe D., Goins W.F., Yamada M., Moriuchi S., Krisky D.M., Oligino T.J., Marconi P.C., Fink D.J., and Glorioso J.C. 1999. Engineering herpes simplex virus vectors for CNS applications. *Exp. Neurol.* **159:** 34–46.

Wu N., Watkins S.C., Schaffer P.A., and DeLuca N.A. 1996. Prolonged gene expression and cell survival after infection by a herpes simplex virus mutant defective in the immediate-early genes encoding ICP4, ICP27, and ICP22. *J. Virol.* **70:** 6358–6368.

# 第二十一章　单纯疱疹病毒I型来源的扩增子载体

William J. Bowers[*‡]和 Howard J. Federoff[*†‡]
Departments of Neurology[*] and Microbiology and Immunology,[†] and the Center for Aging and Developmental Biology,[‡] University of Rochestr School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York 14642
李甫　译

## 摘要

近来，一种基于辅助病毒的技术被用于将单纯疱疹病毒（HSV）扩增载体包装进病毒颗粒。这一包装技术已为细菌人工染色体（BAC）携带单纯疱疹病毒基因组的"无辅助病毒"方法所取代，后者可以避免 HSV 基因组的同类切割/包装序列。使用优化的包装方法将 DNA 重组质粒与这个扩增子质粒共转染能产生仅含有扩增子成分的包装。接下来用蔗糖浓度梯度超速离心浓缩，基于 BAC 方法的无辅助病毒扩增子储液的滴度可以达到大约 $1\times10^8$ 转导单位（TU/ml），其内仅含有特别设计的扩增子而无增殖型回复突变体。这里提出的实验方案能够成功地产生可用于体内体外基因转移的 HSV 扩增子载体。该方案也描述了一种新的基于实时定量 PCR 的测定方法，可以计算出转导颗粒的数量，能更精确地估计出在扩增对比实验中表达和基因转移的功效差异。

## 引言

HSV-1 来源的扩增子质粒由于其分子遗传操作的便利性和多向性可作为一个高度通用的平台（Oehmig et al. 2004)。扩增子加入了一个 HSV 的 DNA 复制起始点（ori）和切割/包装序列的真核表达质粒，（图 1，"a" 序列）。修饰的序列并不编码病毒基因产物，但都作为顺式作用元件促进载体基因组复制和包装入 HSV 颗粒中。由于每个载体基因组都包含有连接转录单位，于是一旦有了转导的发生便会引起转入基因的大量表达。不同大小的各种转录单位能够克隆入一个扩增子质粒中，经过实验验证扩增子质粒最大可插入 150kb 长的片段（Wade-Martins et al. 1999，2001，2003)。

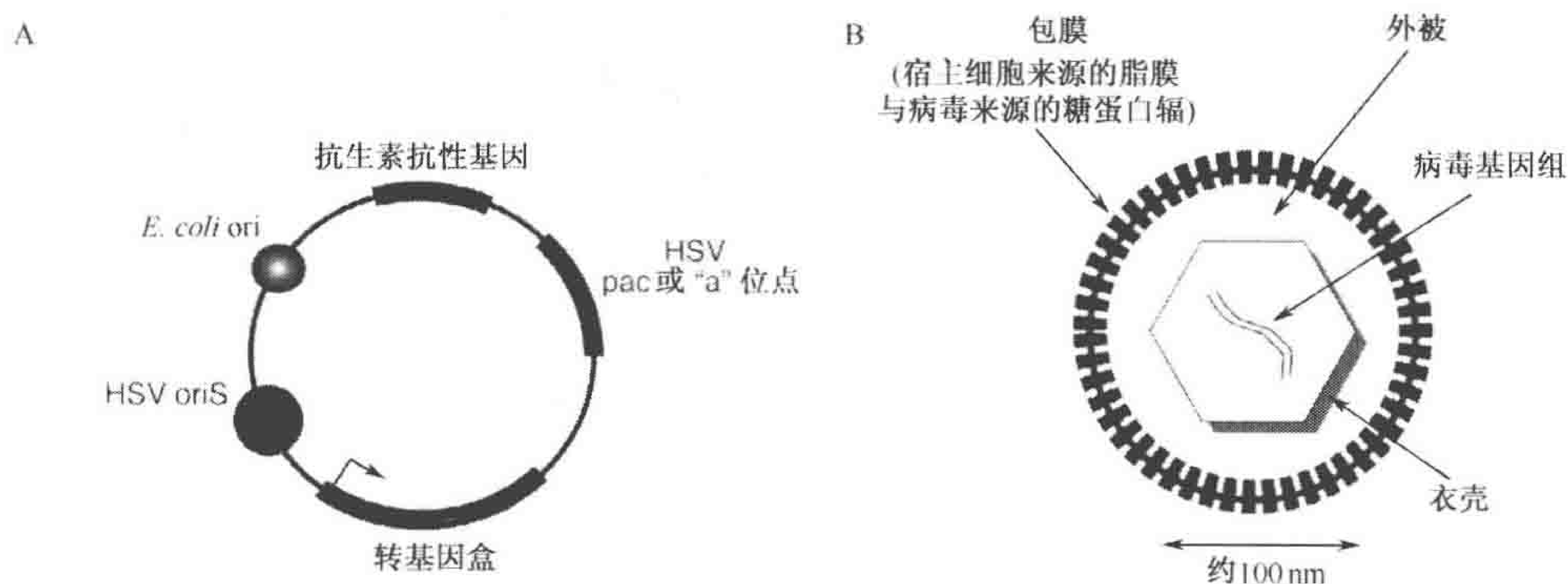



图 1. 一个 HSV-1 扩增子质粒和病毒粒的示意图。A. 在 HSV-1 来源扩增子载体最简单的重复中，它含有两个来自 HSV 的不编码的顺式序列（HSV ori 和 HSV "a" 或 pac 信号)、一个转基因盒、细菌复制和抗生素抗性基因。B. 一旦包装进入病毒粒，HSV 扩增子具有像野生型 HSV-1 粒的包膜、衣壳和核衣壳结构，包被着 150kb 的基因组，单位大小的扩增子基因组拥有头至尾连接重复。

扩增子载体已经被用作许多基因的转移。载体的趋向性广阔，因而可以高效地转入多种类型细胞中。HSV 的主要细胞受体（HveA 和 Nectin-1）已得到确定，它们的广泛表达说明了扩增质粒的多向性（Rajcani and Vojvdova 1998)。尽管天然的 HSV 感染

有局部复制，尤其是在伴随感觉神经元感染的上皮表面，包被质粒的 HSV-1 也能够并高效地感染许多类型的细胞。大量的终末分化类型细胞的高效转导已经在文献里得到广泛阐述（Freese and Geller 1991；Federoff et al. 1992；Geschwind et al. 1993，1994，1996；Xu et al. 1994；Fong et al. 1995；Geller et al. 1995；Lu and Federoff 1995；Jin et al. 1996；Fraefel et al. 1997；Lu et al. 1997；Carew et al. 1998；Coffin et al. 1998；Federoff1998；Parry et al. 1998；Antonawich et al. 1999；D'Angelica et al. 1999；Halterman et al. 1999；Kutubuddin et al. 1999；Yamada et al. 1999；Chen et al. 2001；Tolba et al. 2001；Willis et al. 2001）。

近来，单纯疱疹病毒（HSV）扩增载体被利用一种基于辅助病毒的技术包装进病毒粒。这种方法能产生高滴度的复制子，但不幸的是有辅助病毒颗粒的污染。尽管共同繁殖的辅助病毒有复制缺陷，但是在转导细胞里有低水平的病毒基因表达，最终导致产生细胞毒性。先前的包装技术已经被无辅助病毒方法取代，这种技术采用 BAC 携带一个缺乏同类切割/包装序列的 HSV 基因组。把 DNA 重组质粒和扩增质粒利用优化过的包装方法共转染，导致仅有扩增成分的包装（图 2）。接下来用蔗糖梯度超速离心浓缩，用 BAC 为基础的方法可以使无辅助病毒扩增的滴度达到 $1\times10^8$ TU/ml，其内仅含有特别设计的扩增子而无增殖型回复突变体（Bowers et al. 2001；Saeki et al. 2001，2003）。下面设计的方案能够成功地产生活性的 HSV 扩增载体，可用于体内和体外的基因转移复制。

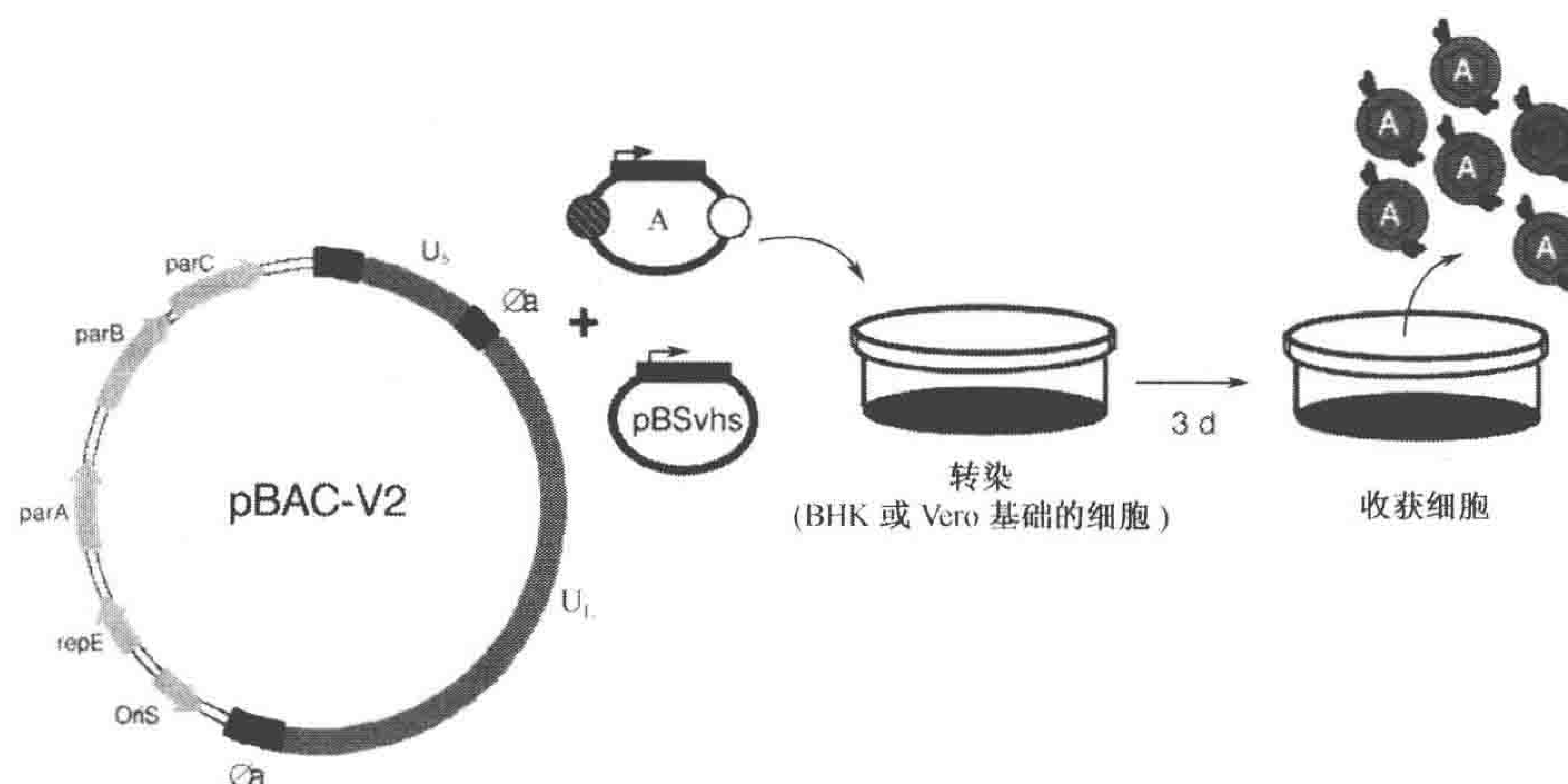



图 2. 图示无辅助病毒 HSV-1 扩增子的包装。无辅助病毒 HSV 扩增子载体的包装需要扩增子质粒 PBAC-V2 和 pBSKS 的高效共转染进入细胞使疱疹复制和颗粒产生。转染后 3d，细胞单层开始释放病毒，然后纯化之为下一步体外和体内基因转移所用。

## 方案 1

# 质粒 DNA 的制备

无辅助病毒的 HSV 扩增子包装需要利用高质量的扩增质粒和附属 pBSKS 病毒颗粒宿主关闭（vhs）质粒 DNA。标准的氯化铯超速离心方法和商业化的质粒 DNA 制备

试剂盒对扩增子的包装效果突出。最终质粒的制备要小心操作以保证伤害最小和减少细菌的存在，因为这些质粒最终要用于真核细胞的转染。用 Bio-Rad Quantum Plasmid Maxiprep Kit 试剂盒能够稳定地获得高质量的质粒 DNA，可以用于扩增和包装，且其操作方法描述的极其详尽。

## 材料

**注意**：标有<!>符号的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖（电泳级；Invitrogen 或相当的产品）
抗生素
　　氨苄青霉素（100μg/ml，Sigma-Aldrich 公司或相当的产品）<!>
　　卡那霉素（10μg/ml，Sigma-Aldrich 公司或相当的产品）<!>
转化有目的质粒 DNA 的 *E. coli* 甘油保藏菌种
内切核酸酶（New England Biolabs 或相当的产品）
无水乙醇<!>
LB 肉汤（EMD Chemicals 或相当的产品）
质粒纯化试剂盒：质粒大提制备试剂盒（Bio-Rad 732-6130）
氯化钠溶液（5mol/L）
TB 肉汤（250ml；Invitrogen 或相当的产品）
双蒸水（$ddH_2O$）

### 仪器

离心机（Sorvall RC5B 或相当的产品）带有 SLC-1500 的转头（Sorvall 或相当的产品）
粗纱布
临床用离心机（IEC GP8R Centra 或相当的产品）
离心管（50ml；Corning 或相当的产品）
温控摇床（Lab-Line 或相当的产品）
电泳胶盒（Owl 或相当的产品）
Erlenmeyer 锥形瓶（2L 体积）
乳胶检查手套（无粉）
微型离心管（1.7ml Axygen 或相当的产品）
Oakridge 瓶（36ml 和 250ml；Thermo-Electron 或相当的产品）
移液器架（Drummond 或相当的产品）
移液枪（可调容量；Rainin P-20、P-200、P-1000 或相当的产品）
一次性移液管（5ml 和 10ml，Kimble 或相当的产品）
分光光度计（Beckman DU 800 或相当的产品）
带帽试管（13mm×100mm；VWR 或相当的产品）

## 方法

1. 将加有抗生素的 3ml 无菌 LB 培养基置于 13mm×100mm 的带帽试管里，把包含有目的质粒的 *E. coli* 菌种接种于其中，37℃下摇床孵育 8h。
2. 将步骤 1 中培养的 3ml *E. coli* 加入 250ml 含有抗生素的无菌 TB 培养基中，置于 2L 的锥形瓶中在 37℃下振荡培养过夜（16～20h）。
3. 在 250ml 离心瓶中置入 250ml 培养液，在 Sorvall RC5B 离心机中以 3795*g* 离心 10min 获得细胞，弃上清。

### 分离质粒 DNA

此方案利用的是 Bio-Rad Quantum Plasmid Maxiprep Kit 试剂盒，有如下修改过的步骤。

4. 用 15ml 重悬液重悬细菌菌粒。
5. 加入 23ml 裂解缓冲液，轻轻混匀。室温（约 22℃）下静置 4min。
6. 加入 15ml 的中和缓冲液，轻轻混匀，室温下静置 3min。
   白色的絮状物将会变清。
7. 4℃下 Sorvall SLC-1500 转头以 16 736*g* 离心 20min。
8. 将上清从一粗纱布滤入 50ml 离心管以除去细胞碎片。
9. 把步骤 8 中滤过的上清液等分置入两个 50ml 离心管中，每管加入 5ml 试剂盒里的 Quantum Matrix。颠转 10 次混匀。
10. 临床用离心机室温 1290*g* 离心 5min。
11. 从两管中移出上清液，用 12.5ml 清洗液重悬沉淀并合并在一个 50ml 离心管内。
12. 临床用离心机室温 1290*g* 离心 5min，弃上清，用 15ml 清洗液重悬沉淀。
13. 将试剂盒中的一个离心柱放入 50ml 离心管中，将悬浮液加入离心柱中。
14. 临床用离心机室温 1290*g* 离心 5min，弃上清。
15. 移去离心柱并注入滤出液。
16. 加 10ml 的洗液到离心柱中，临床用离心机室温 1290*g* 离心 5min。
17. 将离心柱转入一个干净的 50ml 离心管（试剂盒中的），加入 5ml 双蒸水。临床用离心机室温 1398*g* 离心 5min。
18. 加入 2 倍体积的预冷（－20℃）的乙醇，并在每毫升滤出液加入 5mol/L NaCl 溶液 60μl，最终达到 1 倍滤出液的体积，将它们加入 36ml 的 Oakridge 管中。
19. Sorvall RC5B 转头 4℃，20 846*g* 离心 30min。
    放管子的时候注意其方向。
20. 小心的移出上清液，并倒置管子，让质粒 DNA 沉淀在空气中室温下干燥 10min。
21. 向管内加入 500μl 双蒸水，盖上盖子将沉淀面向下在水平摇床上振荡过夜。
22. Sorvall RC5B 转头 4℃，3619*g* 离心 5min，把质粒 DNA 重悬液转入 1.7ml 离心管。
23. 紫外分光光度计测得 $A_{260}/A_{280}$，计算 DNA 的浓度。
24. 用合适的限制性内切核酸酶消化 2μg 质粒 DNA，1%琼脂糖胶分析限制内切核酸酶图谱。

## 方案 2

# 制备 pBAC-V2 DNA

基于 F 质粒的 BAC 的设计用来接纳包装信号删除的野生型 HSV-1 基因组，被用于无辅助病毒的扩增载体包装方案（Stavropoulos and Strathdee 1998；Bowers et al. 2001；Saeki et al. 2001，2003）BAC 能特别地在 *E. coli* 菌株如 DH10b 中维持单拷贝 DNA，并能够用修饰过的商业化试剂盒和方法纯化。由于 BAC DNA 长度巨大，需要小心操作以防止其断裂从而导致 HSV 扩增子包装的效率显著的降低。所以，使用多通道移液器枪头和柔和的用枪技术显得尤为必要。下面的方案利用 QIAGEN Endo-free Plasmid Maga Kit 试剂盒，并有几处修改以用来提高 BAC DNA 的产量和纯度。

## 材料

**注意**：标有＜!▷符号的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖（电泳级；Invitrogen 或相当的产品）

*Bam*HI 限制酶（New England BioLabs 或相当的产品）

氯霉素（Sigma-Aldrich 或相当的产品）＜!▷

转化有 pBAC-V2 重组质粒的 *E. coli* 甘油保藏菌株

乙醇（70%和 100%）＜!▷

异丙醇（100%）＜!▷

LB 肉汤（EMD Chemicals or equivalent）

质粒纯化试剂盒：Endo-free Plasmid Mega Kit（QIAGEN 12381）

### 仪器

离心机（Sorvall RC5B 离心机或相当的产品）带有 SLC-1500 和 SLC-4000 转头（Sorvall 或相当的产品）

粗纱布（VWR 或相当的产品）

电泳胶盒（Owl 或相当的产品）

Erlenmeyer 锥形瓶（125ml 和 2L，Corning 或相当的产品）

滤纸（S&S588 或 606 级；Whatman 59728435）

落地摇床（Lab-Line 或相当的产品）

医用检查乳胶手套（无粉）

Oakridge 瓶（250ml 和 1L；Thermo-Electron 或相当的产品）

移液器架（Drummond 或相当的产品）

移液器及无菌枪头（可调容量；Rainin P-20、P-200、P-1000 或相当的产品）

一次性移液管（5ml、10ml 和 25ml 容积，无菌 Corning 或相当的产品）

紫外分光光度计（Beckman DU800 或相当的产品）

## 方法

### *E. coli* 储存菌液的扩大培养

1. 把 25ml 加有 17$\mu$g/ml 氯霉素灭菌 LB 加入 125ml Erlenmeyer 锥形瓶中，接种 pBAC-V2 *E. coli* 甘油储存液。37℃摇床振荡培养 6h。
2. 准备 4 个 2L 的锥形瓶，每个容有含 17$\mu$g/ml 的 1L LB 培养基。每瓶接种 5ml 步骤 1 中的 pBAC-V2 培养物，室温摇床振荡培养过夜（20～24h）。
3. 将步骤 2 中培养液放在 1L 的离心瓶中，用 SLC-4000 转头 1700*g* 离心 20min 收集菌体，弃上清。

### 分离 BAC DNA

此方案采用 QIAGEN Endo-free Plasmid Mega Kit 试剂盒，并作以下步骤的修改。

4. 用 125ml 的 P1 缓冲液（加有 RNase）重悬菌体沉淀，并将细胞悬液收集入一个瓶子里。
5. 加入 125ml 的 P2 缓冲液，轻轻的混合均匀，室温下静置 5min。
6. 加入 125ml 冰预冷 P3 缓冲液，立即轻轻混匀。置冰上 30min。
7. 4℃以 Sorvall SLC-4000 转头 5200*g* 离心 10min。离心结束后迅速取走离心瓶。
8. 通过用 dd$H_2O$ 润湿的双层纱布过滤上清以去除细胞碎片。
9. 将澄清的滤液再经过湿滤纸过滤。
10. 加 40ml 的 ER 缓冲液到滤过的上清里，旋涡 10 次混匀，置冰上。
11. 平衡 2 支 QIAGEN-tip 2500 柱加入 25ml QBT 缓冲液。
12. 每管中加入一半的滤过的菌液，让菌液由于重力作用通过柱中间树脂滤膜层。
13. 用 220ml QC 缓冲液漂洗每个管子。
14. 用 QN 缓冲液 56℃漂洗 5 次以洗脱每个管子中的 DNA，每次 10ml。将洗脱的 DNA 收集入 250ml 的 Oakridge 瓶。
15. 用 0.7 体积室温异丙醇沉淀 pBAC-V2 DNA。
16. 接下来用 SLA-1500 转头于 4℃，15 000*g* 离心 40min。

    放瓶子的时候注意初始方向。
17. 小心移去异丙醇并吸干瓶子。
18. 每个瓶子用 2.5ml 无内毒素的 $H_2O$ 重悬 pBAC-V2 DNA，拧松瓶盖室温下放置将残留的异丙醇挥发。
19. 在 4℃冷却过夜。
20. DNA 聚集面向下，在水平摇床上摇动管子 2h。
21. 紫外分光光度计测得 $A_{260}/A_{280}$，计算 DNA 的浓度。

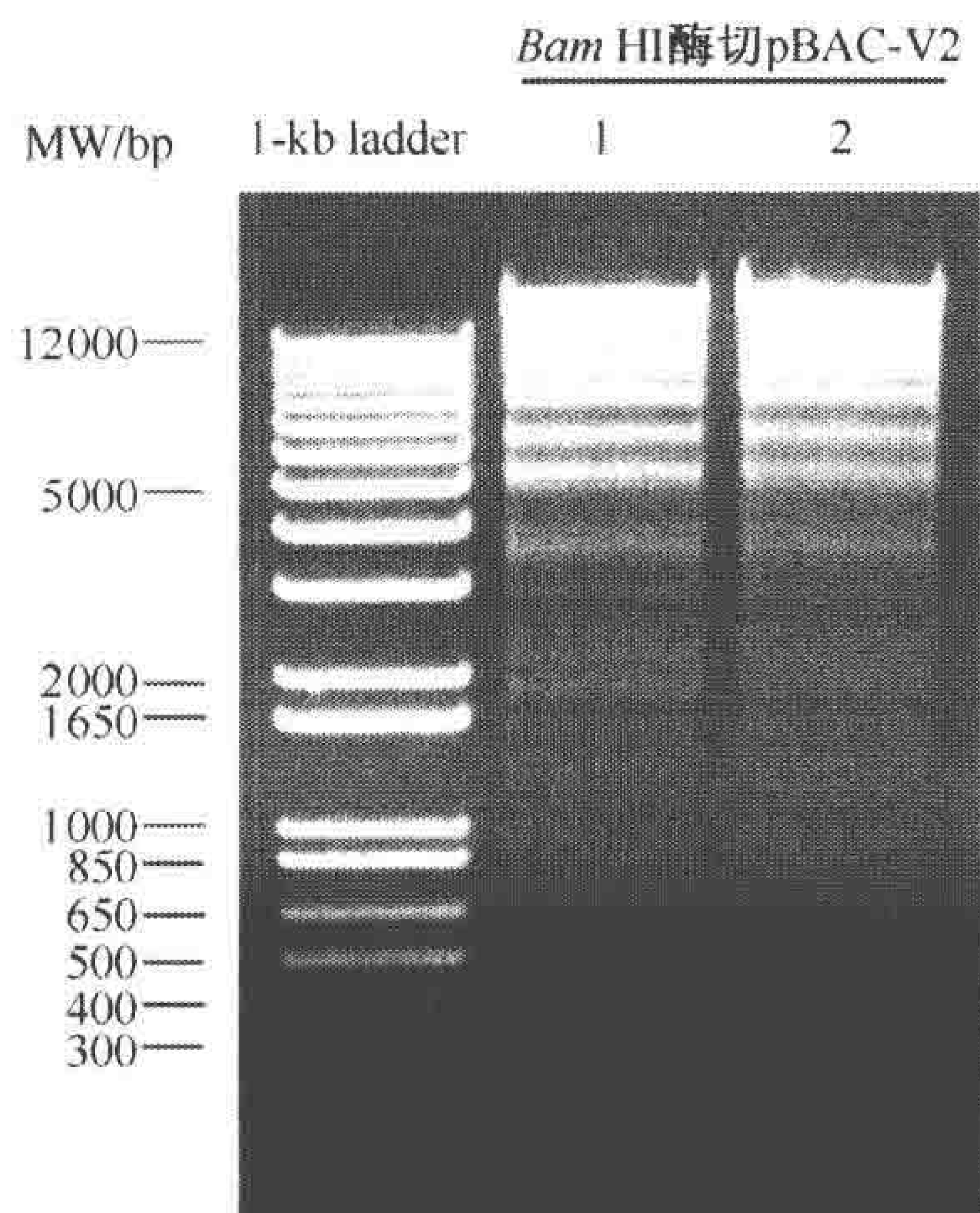



图 3. 用 *Bam*HI 酶切过的 pBAC-V2 BAC 重组质粒的 DNA 条带图谱。pBAC-V2（2$\mu$g）用 4 个单位的 *Bam*HI 限制酶完全消化，0.8%琼脂糖胶电泳并用溴化乙锭染色分析，旁边 1kb 分子质量梯度作为标准。

22. 用 *Bam*HI 限制酶消化 2μg pBAC-V2 DNA，0.8%琼脂糖胶分析限制内切核酸酶图谱（图 3）。

## 方案 3

# BHK 包装细胞系的维持与扩大培养

无辅助病毒的 HSV 扩增载体的制备需要一种包装细胞系。这种包装细胞系要有以下特点：允许 HSV 的复制与繁殖、细胞培养能高密度生长、体外的低传代次数，高效的转染效率。最常用的符合以上要求的扩增包装细胞系有来自 Vero（非洲绿猴）和幼年大鼠肾（BHK-1）细胞。维持这些细胞系需要在层流生物安全柜的洁净环境里，使用标准的无菌操作技术防止污染，有规律地传代培养（每 2～3d 一次）。

## 材料

**注意**：标有< !>符号的材料的处理方法见附录。

### 试剂

BHK-21 细胞（ATCC：CCL-10）

完全生长培养基

DMEM 培养液，无菌、高糖、添加 L-谷氨酸、无 S-丙酮酸（Invitrogen 或相当的产品）

无菌 10%胎牛血清（FBS），通过支原体测试

10%青霉素/链霉素（10 000IU/ml；Invitrogen 或相当的产品）< !>

Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS），无菌、无 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$

TE（0.25%胰酶/0.02%EDTA；Invitrogen）< !>

### 仪器

层流生物安全柜（Baker Steriguard II 或相当的产品）

离心管（conical，15ml 和 50ml，无菌；Corning 或相当的产品）

临床台式离心机（IEC GP8R Centra 或相当的产品）

水浴式 $CO_2$ 孵箱［(37±1.0)℃，5% $CO_2$；Forma 或相当的产品］

培养瓶（T-150，无菌；Corning 或相当的产品）

冰箱：标准（－20℃）和超低温（－80℃）

血球计数板

倒置相差显微镜（Zeiss Telaval31 或相当的产品）

医用乳胶检查手套（无粉）

微型离心管（无菌，0.5ml 和 1.7ml）

微型漩涡器（VWR 或相当的产品）

移液器架（Drummond 或相当的产品）

移液器及无菌枪头（可调容量；Rainin P-20、P-200、P-1000 或相当的产品）

一次性移液管（5ml、10ml 和 25ml 容积，无菌）

水浴锅，(37±1.0)℃（VWR1235 或相当的产品）

## 方法

1. 37℃水浴预热 TE 和完全培养基。
2. 接种 BHK 细胞在显微镜下检查汇合度及有无细菌或真菌污染的迹象。

   细胞应该 80%～100%的汇合。
3. 在生物安全柜内无菌操作移去并丢弃融合细胞的培养液。
4. 用 5ml 无 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ 的 DPBS 洗细胞，丢弃洗液。
5. 用无 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ 的 DPBS 1∶1 稀释预热的胰酶，在每个细胞瓶中加入稀释过的胰酶 2ml，轻轻摇匀以均匀的覆盖单层细胞。
6. 室温下或 37℃孵育细胞瓶直到细胞分离。

   大约每 5min 观察细胞的分离情况并轻轻摇动细胞瓶使之加速分离
7. 用 10ml 预热的完全培养基冲洗仍附着在瓶底部的细胞，轻柔地吹打几次重悬细胞。
8. 移去 8～10ml 的悬浮细胞，用同样的体积悬浮第二瓶细胞；重复直至所有的（至多 5 瓶）T-150 培养瓶细胞都悬浮起来，收集所有的悬浮细胞到一个瓶子中。
9. 吸取 1ml 的重悬细胞至 15ml 的锥形离心管中，加入 9ml 完全培养基，轻轻吹打混合均匀。
10. 加大约 10μl 的稀释细胞至血球计数板上。
11. 计数血球计数板每条边上（格子的四角）$4mm^2$ 的所有细胞，确定每平方毫米的细胞平均数，乘以稀释倍数，其结果乘以 $10^4$。

    此步骤阐明了富集细胞每平方毫米的数量。
12. 利用上述细胞计数确定每个包装方案的种板体积。

    计算的体积应该有 $1.5\times10^7$ 个细胞（见方案 4）。
13. 将用步骤 12 决定体积中的一半把剩下的细胞次培养。

## 方案 4

# 无辅助病毒的 HSV-1 扩增的包装

无辅助病毒 HSV 扩增载体的包装需要高效共转染进 BHK-1 细胞中 3 个 DNA 重组质粒：扩增质粒、pBAC-V2 BAC 和 pBSKS（vhs）质粒。已有数种转染技术在此方案中得以试验。Invitrogen 公司的 Lipofectamine-PLUS 试剂在无辅助病毒扩增包装中实验性质稳定可靠。其他脂质体为基础的方法亦可使用，但是它们的效率需根据扩增不同而以经验判断。而且，当在操作 pBAC-V2 重组质的时候必须尽量小心以防止其断裂，这样会显著降低载体的滴度。下面的方案能够在每个 T-150 瓶的 BHK-21 单层细胞中获得 $1\times10^6$～$5\times10^6$ 的转导颗粒。

## 材料

**注意**：标有＜！＞符号的材料的处理方法见附录。

## 试剂

BHK-21 细胞（ATCC：CCL-10）

这些细胞如方案 3 中步骤 13 所述种板，在做包装实验前至少培养了 3d，细胞达到 80%～100%的汇合度，传代 BHK 细胞并以 T-150 瓶所需的一半细胞数目种板准备包装实验。体外处理后细胞传代数应该小于 30。

脱色液（10% *V*/*V*）

DMEM 培养液，无菌、高糖、添加 L-谷氨酸、无 S-丙酮酸（Invitrogen 或相当的产品）Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS）、无菌、无 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$

乙醇（70% *V*/*V* 和 100%）<!>

无菌 10%胎牛血清（FBS），通过支原体测试

10%青霉素/链霉素（10 000IU/ml；Invitrogen 或相当的产品）<!>

环己二乙酰胺（HMBA；0.5mol/L，过滤除菌）（Sigma -Aldrich）

蒸馏水（$dH_2O$），灭菌

转染试剂 Lipofectamine（Invitrogen 18324-012）

Opti-MEM（Invitrogen 31985-070）

质粒

扩增质粒 DNA（根据方案 1 制备）

pBAC-V2 DNA（或相当的产品，根据方案 2 制备）

pBSKS（vhs）质粒 DNA（根据方案 1 制备）

PLUS 试剂（Invitrogen 11514-015）

氯化钠（5mol/L）

## 仪器

无辅助病毒 HSV-1 扩增包装的设备要求同方案 3 一样，有以下其他仪器：

细胞刮

水浴式 $CO_2$ 孵箱［(34±1.0)℃，5%$CO_2$；Forma 或相当的产品］

## 方法

1. 在生物安全柜无菌操作，每个 T-150 瓶接种 $1.5\times10^7$ 个 BHK-21 细胞。37℃孵育过夜。
2. 用乙醇沉淀扩增质粒和 pBSKS（vhs）质粒 DNA。
3. 在每个微离心管内，加入足量的（以 μl 计）扩增载体质粒和 pBSKS（vhs）质粒 DNA 以达到每瓶每种质粒产生 7μg 用来包装病毒。加入无菌水使之终体积为每管 100μl。
4. 对每 100μl 稀释的 DNA，加入 6μl 5mol/L NaCl 和 200μl 的无水乙醇混合均匀，−20℃冰冷至少 30min 或过夜。
5. 4℃，10 000*g* 离心 20min 以沉淀 DNA。

6. 在生物安全柜内将管内乙醇吸出，用1.7ml的70%乙醇漂洗DNA沉淀。
7. 在生物安全柜内吸出乙醇并将管子倒置干燥沉淀10min（不要过干）。
8. 用50ml无菌水重悬沉淀，4℃冷藏过夜。

   如果样品在无水乙醇中冷冻过夜（步骤4），可略去过夜冷藏。当乙醇沉淀后立即进行下面步骤（步骤5～8）。

9. 在生物安全柜将转染试剂混合物准备好。

   为每个瓶中的HSV-1扩增的包装准备一批转染试剂混合物。

   a. 在一15ml试管中，加入3ml的Opti-MEM（温至37℃）、25μg pBAC-V2 DNA、7μg扩增质粒DNA、7μg pBSKS（vhs）DNA，混合均匀。
   b. 向管中1ml Opti-MEM加入71μl的PLUS试剂。

      如果在加入PLUS试剂时候有沉淀，丢弃掉并重复上述步骤。

   c. 向另一个15ml试管中加入2ml Opti-MEM。
   d. 向第二个管中加入107μl Lipofectamine。
   e. 室温下将两支管子温育20min。
   f. 非常缓慢地将第一管和第二管内容物混合（超过30s）。让Lipofection混合物在室温下静置20min。

   如果在混合的时候发现有DNA沉淀，弃去并重复步骤9。

10. 在温育转染液混合物的时候，移去BHK包装细胞的培养液，每个培养瓶中加入12ml的Opti-MEM。
11. 用一个10ml的枪把转染混合液加入到T-150瓶中的细胞里，轻轻混匀，在37℃下孵育5h。
12. 加16ml含有20% FBS的DMEM和2mmol/L的HMBA至每个瓶中，34℃温育过夜。
13. 在生物安全柜里将每个瓶中培养液移去，用25ml的含有10% FBS的DMEM和2mmol/L的HMBA继续培养。
14. 34℃温育培养瓶2～3d。
15. 在生物安全柜里移去每瓶的细胞培养液。
16. 把细胞刮进10ml冷的无$Ca^{2+}/Mg^{2+}$的DPBS中，将每个瓶中刮下的细胞收集在一个50ml管子中，置冰上。
17. 用10ml冷的无$Ca^{2+}/Mg^{2+}$的DPBS冲洗瓶中残留的细胞，一直将管子置于冰上。
18. 250*g*离心管子10min。
19. 把DPBS倒入一个烧杯中，其中有10%的脱色液使释放出的病毒失活。
20. 在1.5ml瓶中加入无$Ca^{2+}/Mg^{2+}$的DPBS重悬沉淀（沉淀中有细胞固定的扩增病毒颗粒），轻轻吹打均匀。
21. 在扩增颗粒纯化前应于－80℃冰冻重悬的沉淀至少1h（见方案5）。

## 方案5

# 超速离心法提纯包装的HSV扩增子

一旦扩增载体已经增殖（方案4），病毒颗粒需要为下一步体内和体外使用进行纯

化并浓缩。结合超声、低速离心和蔗糖梯度超高速离心可重复地提纯出扩增载体，其滴度为每毫升 $1\times10^7\sim5\times10^7$ 个转化颗粒。

## 材料

**注意**：标有< !>符号的材料的处理方法见附录。

### 试剂

干冰 < !>
含钙离子和镁离子的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS），无菌
乙醇（70% *V*/*V*）< !>
溶于含钙离子和镁离子的 DPBS 蔗糖溶液（30% *V*/*V*），过滤除菌

### 仪器

Bioguard 生物安全柜（Baker Steriguard II 或同类产品）
离心管（锥形，15ml 和 50ml，无菌；Corning 或同类产品）
医用台式离心机（IEC GP8R Centra 或同类产品）
Cup 超声仪（Misonix XL2010 或同类产品）
镊子
冰箱：超低温（−80℃）
乳胶检查手套（无粉）
微型离心机（IEC Micromax 或同类产品）
微量离心管（0.5ml 和 1.7ml，无菌；Axygen 或同类产品）
微型涡旋振荡器（VWR 或同类产品）
PA 离心管（36ml 容量，Sovall 03141 或同类产品）
电动移液器（Drummond 或同类产品）
移液器和无菌吸头（可调体积；Rainin P-20、P-200 和 P-1000 或同类产品）
超速离心机（Sorvall Discovery 100S 或同类产品）
水平转子（Sorvall 630/17 Surespin 或同类产品）
离心桶（预冷，Sorvall 79338 或同类产品）
Q 吸头（无菌）
一次性移液管（5ml、10ml 和 25ml 容量，无菌）
水浴锅，(37±1)℃（VWR 1235 或同类产品）

## 方法

1. 预冷超速离心桶（在冰箱里）和转子（在超速离心机里）。
2. 用 70%乙醇清洗 36ml 的超速离心管两次。用无菌的 Q-tip 清除所有剩余乙醇，倒置放在生物安全橱中空气干燥。

3. 在 37℃中水浴解冻以前得到的病毒（从方案 4 的步骤 21 中）。放置在冰上。

4. 使用杯形超声仪（在冰上预冷）在第 8 个设置超声处理每个样品 3 次，开 30s 后关闭 30s。

   每次超声两个解冻的样品，经常加入新鲜的冰。

5. 1290 *g* 离心病毒 10min。

6. 加入 5～7ml 含钙离子和镁离子的冷 DPBS 到超速离心管。

7. 再加入 7～10ml 冷的、无菌的溶于 DPBS 的 30% 蔗糖到每个管中。

8. 转移病毒上清（步骤 5）到一干净的 5ml 锥形管，再次 1290 *g* 离心 10min。

9. 第二次离心后，一滴一滴地加入澄清的病毒上清到蔗糖梯度超速离心管中。

10. 加入充分的含钙离子/镁离子冷的 DPBS 到每管中直至离顶部 0.25cm。

11. 使用 70% 乙醇除菌的镊子将管子放在预冷的桶趾。小心地换下并固定桶的盖子。

12. 4℃在超速离心机中 78 000 *g* 梯度离心 1h。

13. 从每个超速离心管中倒出上清，用无菌的 Q 吸头清除残余的蔗糖。

    病毒出现在管的底部，略带黄色的沉淀。

14. 在收取过程中，在每个 T-150 瓶里加入 100μl 含钙离子和镁离子的 PBS。置冰上不超过 30min 用来软化沉淀。

15. 小心吹打使沉淀重新悬浮，并使沉淀团块打散。

    小心不要产生气泡。

16. 转移悬液到 1.7ml 无菌的微量离心管中。瞬时离心（小于 3s），使所有不能悬浮的蛋白质碎片沉淀。

17. 分装 25～100μl 病毒悬液到已标记、预冷的、无菌的 0.5ml 微量离心管中。立即放在干冰上冰冻。放在标记的冰盒或冰袋中－80℃储存。

## 方案 6

## β-半乳糖苷酶表达型扩增载体

表达 β-半乳糖苷酶作为报道基因的包装 HSV 扩增载体颗粒可以用标准组织化学技术很容易地进行计数。这包括用系列体积的纯化病毒转化滴定细胞系（如 NIH-3T3 成纤维细胞）的单层细胞，然后用 X-gal 组织化学进行处理。表达 β-半乳糖苷酶阳性的细胞将产生由裂解 X-gal 底物形成的蓝色不溶沉淀。这些细胞可以用带毫米标尺目镜的倒置反差显微镜进行计数。转化中使用的每个初始病毒体积的细胞计数可以用于计算载体滴定度，表示为 TU/ml。

### 材料

**注意**：标有＜！＞符号的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

Dulbecco 基本培养基（DMEM；GIBCO-BRL），无菌、高糖、含 L-谷氨酰胺、无

硫丙酮酸（Invitrogene 或其他同类产品）
Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS），无菌、无钙离子/镁离子
乙醇（70% *V/V*）<!>
胎牛血清（FBS；无菌，支原体检查）
戊二醛（25%）<!>
铁溶液：
165mg 氰化钾 <!>
211mg 亚铁氰化钾<!>
20mg 的 NP-40（Tergitol）<!>
10mg 脱氧胆酸钠<!>
19mg 氯化镁 <!>

加入 PBS 使总体积为 100ml。用锡箔封住瓶口，储存在 4℃中。

NIH-3T3 细胞（ATCC：CRL-1658）
TE（0.25% 胰酶/0.02% EDTA；Invitrogen）<!>
水，去离子（$dH_2O$），无菌
X-gal 原液（5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷；20mg/ml 二甲基亚砜）<!>

## 仪器

Bioguard 生物安全柜（Baker Steriguard II 或同类产品）
细胞培养皿（24 孔；Corning 或同类产品）
细胞刮刀（大号；Nunc 或同类产品）
离心管（锥形，15ml 和 50ml，无菌；Corning 或同类产品）
$CO_2/H_2O$-套式培养箱［（37±1.0）℃，5% $CO_2$；Forma 或同类产品］
培养瓶（T-150，无菌；Corning 或同类产品）
冰箱：标准（−20℃）和超低温（−80℃）
血细胞计数板
倒置相差显微镜（Zeiss Telaval 31 或同类产品）
乳胶检查手套（无粉）
微量离心管（0.5ml 和 1.7ml，无菌；Axygen 或同类产品）
微型离心机（National Labnet C-1200 或同类产品）
微型涡旋振荡器（VWR 或同类产品）
电动移液器（Drummond 或同类产品）
移液器和无菌吸头（可调体积；Rainin P-20、P-200 和 P-1000 或同类产品）
一次性移液管（5ml、10ml 和 25ml 容量，无菌）
水浴锅，（37±1）℃（VWR 1235 或同类产品）

## 方法

1. 为需要滴定的所有孔预热足够的 TE 和含 5%胎牛血清的 DMEM 培养液到 37℃。

2. 在生物安全柜操作，无菌移除细胞里的完全培养基。
3. 小心用 5ml 无钙离子和镁离子的 DPBS 清洗细胞，去除液体。
4. 用无钙离子和镁离子的 DPBS 1∶1 稀释 TE。加入 2ml 稀释的 TE 到每个 NIH-3T3 细胞瓶里。
5. 在室温或 37℃中孵育细胞直到细胞完全脱离瓶底。

   每 5min 观察一次，轻轻晃动，使细胞脱落。

6. 加入大约 10ml 含 5%胎牛血清的 DMEM 使细胞脱落。小心吹打细胞使悬浮。
7. 在 15ml 离心管中，稀释 0.5ml 悬浮细胞到 4.5ml 生长培养基中。吹打使完全悬浮。
8. 加入约 10μl 悬浮稀释细胞到血细胞计数板。
9. 计算血细胞计数板每条边上 $4mm^2$（四个角的格）的所有细胞。确定每平方毫米的细胞平均密度。用稀释倍数乘以平均密度。对结果再乘以 $10^4$。

   这个数目相当于每毫升原细胞悬液中的细胞数。

10. 根据这个细胞数，用预温的生长培养基稀释细胞到终浓度 $2\times10^5$ 个/ml。吹打混合均匀。
11. 加入 0.5ml 含 5%FBS 的 DMEM 到 24 孔板的每个孔内。
12. 使用 5ml 的移液器加入 0.5ml 的稀释细胞到每个孔中，最终的种板浓度为每孔 $1\times10^5$ 个细胞。
13. 37℃孵育培养板过夜。

## 转导

14. 稀释 1～5μl 等分的扩增病毒到要滴定的 350ml 预温的含 5% FBS 的 DMEM 中。每管涡旋混合约 1s。
15. 在生物安全柜中操作，无菌地从细胞中除去生长培养基。用准备的病毒悬浮液代替。
16. 37℃孵育培养板 1h。每 15min 轻轻摇晃板子均匀分散病毒。
17. 在生物安全柜中操作，无菌地加入 400μl 预温的含 5% FBS 的 DMEM 到每个孔中。
18. 在 37℃孵育培养板 20～48h（取决于引导 β-半乳糖苷酶转基因的扩增所在的启动子）。

## 转导细胞的固定

19. 从培养箱中取出培养板，除去生长培养基。

   这一步不需要无菌操作。

20. 用约 1ml PBS 小心清洗每个孔。
21. 加入 400μl 1%的戊二醛到每个孔中。
22. 在室温孵育 10min。
23. 去除戊二醛。用 1ml PBS 清洗每个孔。

   固定的单层细胞可以在 PBS 中于 4℃保存直到准备进行组织化学染色，测定 β-半乳糖苷酶活性。

### 转导细胞的组织化学染色

24. 准备 X-gal 染色溶液（每毫升铁溶液中 40μl X-gal 原液）。

    为要处理的每个转化了的单层细胞准备 500μl X-gal 染液。
25. 除去每个孔中的 PBS 残液（步骤 23）。
26. 每孔中加入 500μl X-gal 染液。
27. 37℃孵育过夜。
28. 除去 X-gal 染液。用 500μl PBS 清洗单层细胞。
29. 除去清洗液，再加入 500μl PBS。

    细胞可以保存在 4℃中直到分析。

### 计数 β-半乳糖苷酶表达细胞和滴定数

30. 使用倒置相差显微镜，用 20×物镜和分划板观察 β-半乳糖苷酶表达细胞（图 4，见彩版）。
31. 计算 10～20 个有代表性的视野中蓝色细胞数。
32. 求每个视野里染色细胞的平均数。
33. 用系数 752 乘以这个平均数。
34. 除以初始用于转化单层细胞的微升数。
35. 乘以 1000 得到浓病毒储液的滴定数，表示为蓝色形成单位（bfu）/ml。

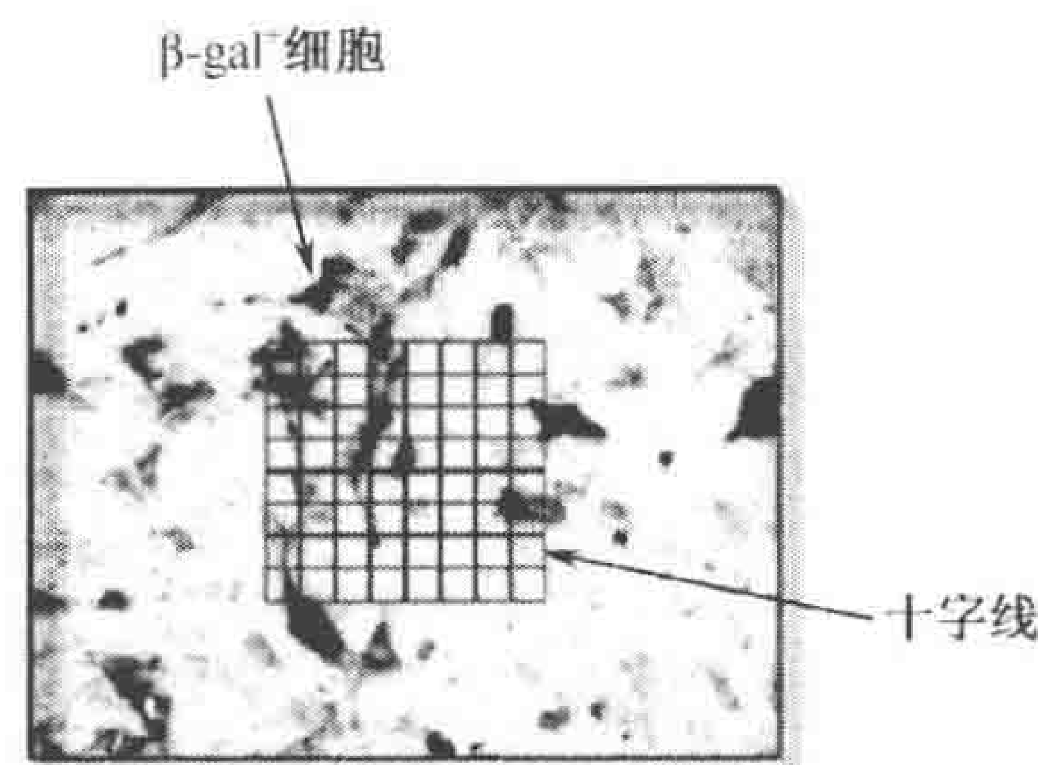



图 4. 用表达 β-半乳糖苷酶（HSVlac）HSV 扩增子转导 NIH-3T3 细胞进行基于表达的滴定分析。用 0.5μl 纯化的 HSVlac 扩增子转导 NIH-3T3 细胞。24h 后，用 1%戊二醛固定单层细胞，并进行 X-gal 组织化学处理。β-半乳糖苷酶阳性细胞被染成蓝色，图上标出的十字线为用于计数阳性细胞的标尺。

## 方案 7

## 扩增子转导滴定

在载体设计过程中，为了对载体的对比和改进进行准确评估，需要一套滴定病毒储存液的标准。通常利用报告基因表达单位对有感染力的扩增子颗粒进行定量（方案 6）的方法来滴定包装的扩增载体。启动子的强度、基因产物测定的灵敏度和待滴定的细胞类型等因素，都能较大程度地影响感染性病毒颗粒的表观数量。当对两个有不同启动子的扩增载体进行对比时，这种效果更加明显。对此，一种利用实时定量 PCR 技术的新滴定方法能对转导颗粒进行计数（Bowers et al. 2000）。这种方法保证了扩增对比实验开始时有相同的转导单元，从而能对基因表达和转基因效率的差异进行公平地评估。

### 材料

**注意**：标有<!>符号的材料的处理方法见附录。

## 试剂

Bleach 溶液（10% *V/V*）<!>

氯仿/异戊醇混合液（24∶1 *V/V*）<!>

2×消化缓冲液

  0.2mol/L NaCl

  0.02mol/L Tris-HCl（pH 8.0）<!>

  50mmol/L EDTA（pH 8.0）

  0.5% SDS<!>

二硫苏糖醇（DTT；1mol/L）<!>

DMEM 培养液，高糖、有 L-谷氨酰胺、无 S-丙酮酸、无菌（Invitrogen or equivalent）

Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS），无菌、有和没有 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$

乙醇（70% *V/V* 和 100%）

FAM/TAMRA（5-羧基荧光素/*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基-6-羧基玫瑰红）标记的荧光基因探针（表 1）

  扩增子特异的（Synthegen 或 equivalent）

  细胞特异的（Synthegen 或 equivalent）

胎牛血清（FBS），无菌、经过支原体检测

裂解液

  100mmol/L 磷酸钾（pH 7.8）<!>

  0.2% Triton X-100<!>

NIH-3T3 细胞（ATCC：CRL-1658）

PCR 引物，正义链和反义链（表 1）

  扩增子特异的（Synthegen 或 equivalent）

  细胞特异的（Synthegen 或 equivalent）

**表 1．用作转导滴定配套的 TaqMan 引物/探针**

| 名字 | 上游引物 | 下游引物 | 探针 |
|---|---|---|---|
| β-牛乳糖 | 5′-GGGATCTGCCATTGT-CAGACAT-3′ | 5′-TGGTGTGGGCCATAAT-TCAA-3′ | 5′-ACCCCGTACGTCTTC-CCGAGCG-3′ |
| 卡那霉素 | 5′-CCGGCTACCTGCCCAT-TC-3′ | 5′-CCGGCTTCCATCCGAG-TA-3′ | 5′-AACATCGCATCGAGCG-AGCACG-3′ |
| β-内酰胺酶 | 5′-CTGGATGGAGGCGGA-TAAAGT-3′ | 5′-CGGCTCCAGATTTAT-CAGCAAT-3′ | 5′-CAGGACCACTTCTG-CGCTCGGC-3′ |
| 18S RNA | 5′-CGGCTACCACATCCAA-GGAA-3′ | 5′-GCTGGAATTACCGCG-GCT-3′ | 5′-TGCTGGCACCAGAC-TTGCCCTC-3′ |

PCR 标准品

  18S 标准品：NIH-3T3 细胞的基因组 DNA（50、5、0.5、0.05 和 0.005ng/ml）

  扩增子标准品：待滴定病毒特异的扩增质粒 DNA（1.0、0.1、0.01、0.001

和 0.0001ng/ml）

苯酚（饱和溶液）<!>

蛋白酶 K（20mg/ml）<!>

氯化钠（5mol/L）

TE（0.25%胰岛素/0.02%EDTA；Invitrogen）<!>

2×PCR 混合母液（Applied Biosystems 或 equivalent）

水，蒸馏水（$dH_2O$），无菌

## 仪器

工作纸（吸水的）

生物安全橱（Baker steriguard II 或 equivalent）

细胞培养板（24 孔；Corning 或 equivalent）

细胞刮（大号的；Nunc 或 equivalent）

离心管（锥形，15ml 和 50ml，无菌；Corning 或 equivalent）

$CO_2$/$H_2O$ 培养箱 [(37±1.0)℃，5%$CO_2$；Forma 或 equivalent]

培养瓶（T-150；无菌；Corning 或 equivalent）

冰箱：标准温度（−20℃）和超低温（−80℃）

红血球计数板

冰盒

倒置相差显微镜（Zeiss Telaval31 或 equivalent）

Latex 手套（无粉）

微离心管（0.5ml 和 1.7ml，无菌）

小离心机（National Labnet C-1200 或 equivalent）

小振荡器（VWR 或 equivalent）

封口膜

PCR 管和 PCR 管盖（光学级别；Applied Biosystems 或 equivalent）

辅助性移液器（Drummond 或 equivalent）

带无菌枪头的移液器（可调体积；Rainin P-20、P-200 和 P-1000 或 equivalent），两套

为了最大限度地减少核酸污染，应为定量 PCR 分析指定一套专用的带滤器枪头和一套移液器

防护袖套（一次性）

序列测定仪（Applied Biosystems Prism 7700 或 equivalent）

一次性移液管（5ml、10ml 和 25ml 体积，无菌）

紫外/可见光分光光度计（Beckman Coulter DU 800 或 equivalent）

水浴，(37±1)℃（VWR 1235 或 equivalent）

# 方法

## 接种 NIH-3T3 细胞

1. 根据滴定所需的孔数，预温足够的含 5% FBS 的 TE 和 DMEM 至 37℃。

2. 在安全橱中，吸去细胞培养液。
3. 用 5ml 无 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ 的 DPBS 清洗细胞。弃洗液。
4. 用无 $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ 的 DPBS 按 1∶1 的比例稀释 TE。在每个 NIH-3T3 细胞的培养瓶中加入 2ml 稀释的 TE。
5. 室温或 37℃孵育细胞，直至其完全脱落。

   每 5min 观察一次，轻轻晃动使细胞脱落。

6. 在脱落的细胞中加入约 10ml 含 5% FBS 的 DMEM。用移液器轻轻吹打以悬浮细胞。
7. 在 15ml 的锥形管中，将 0.5ml 的悬浮细胞加入 4.5ml 的培养液中。吹打以悬浮细胞。
8. 加约 10μl 的悬浮液到红血球计数板上。
9. 计算计数板两边 $4mm^2$ 方格（栅格的四角）中细胞的数量。计算每平方毫米方格中的平均细胞数。乘以稀释倍数。将结果再乘以 $10^4$。

   得到的结果表示在原细胞悬液中每毫升的细胞数。

10. 根据细胞计数的结果，用预温的培养液将细胞稀释到最终浓度为 $2\times10^5$ 个/ml。吹打以混匀。
11. 在 24 孔板的每个孔中加入 0.5ml 含 5% FBS 的 DMEM。
12. 用 5ml 的移液器，每个孔中加 0.5ml 的稀释后细胞液，使最终浓度为每孔 $1\times10^5$ 个细胞。
13. 37℃将培养板孵育过夜。

## 转导

14. 将 1μl 和 5μl 待滴定的扩增子病毒储存液稀释在 350ml 预温的含 5% FBS 的 DMEM 培养液中。振荡每管约 1s。
15. 在安全橱中，吸出细胞培养液。加入备好的病毒悬液。
16. 将培养板 37℃孵育 1h。每 15min 轻轻旋转平板，使病毒均匀分散。
17. 在安全橱中，每个孔中加入 400μl 含预温 5% FBS 的 DMEM 培养液。
18. 将培养板 37℃孵育 20～24h。

## 裂解并消化转导后的细胞

19. 当细胞形成单层后，吸出培养基。
20. 每孔加入 100μl 含 1mmol/L DTT 的裂解缓冲液。室温孵育 15min。
21. 将裂解液转到 1.7ml 的离心管中。
22. 每管加入 100μl 含 0.2mg/ml 蛋白酶 K 的 2×消化缓冲液。56℃孵育 3h。

## 苯酚/氯仿抽提

23. 用氯仿∶异戊醇混合液按 1∶1 的比例稀释饱和的苯酚溶液。每管中加入 200μl 苯酚∶氯仿∶异戊醇混合液。颠倒 10 次以充分混匀。
24. 13 000*g* 离心 5min。
25. 小心吸出水（上）层，转移到新的 1.7ml 离心管中。

26. 每管加入 200μl 氯仿：异戊醇混合液。颠倒 10 次以充分混匀。

27. 13 000*g* 离心 5min。

28. 小心吸出水（上）层，转移到新的 1.7ml 离心管中。

29. 每管中加入 375μl 的 100% 乙醇。将样品－80℃孵育 15min 或－20℃孵育 1～2h。

30. 13 000*g* 离心 20min。

31. 小心移去上清。用 500μl 70% 乙醇小心清洗 DNA 沉淀。让沉淀风中干燥 10min。

32. 用 50μl $dH_2O$ 重悬 DNA 沉淀。

33. 用分光光度仪测定 $A_{260}/A_{280}$。计算 DNA 浓度。

34. 将每个样品稀释至最终浓度为 5～20ng/μl，以用于 PCR 分析。

    最优的稀释度因仪器而异。Applied Biosystems Prism 7700 序列测定仪能对稀释至 5ng/μl 的储存液进行测定，并产生足够的扩增谱。其他的仪器可能需要相似或更高浓度的模板 DNA 储存液。

## 实时定量 PCR 分析

35. 用与序列测定仪相连的电脑上的软件准备样品模板（表 2）。

    **注意：**在所有的步骤中穿戴工作服、手套和防护袖套。在步骤 46 之前不要处理 DNA 标准品或待滴定 DNA 样品。

**表 2. 定量 PCR 样品建立的范例**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | NTC | NTC | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl | STD Ampl |
| B | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl |
| C | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl |
| D | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | UNK Ampl | NTC | NTC | 18S STD | 18S STD | 18S STD | 18S STD | 18S STD |
| E | STD 18S | STD 18S | STD 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S |
| F | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S |
| G | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S |
| H | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK 18S | UNK | UNK |

（NTC）无模板的对照（没有 DNA 加入）；（STA）带有 FAM-标记的扩增子特异荧光探针的标准扩增子质粒 DNA 对照；（UNK Ampl）带有 FAM-标记的扩增子特异荧光探针的未知转导 DNA 样品；（STD 18S）带有 FAM-标记的 18S 基因特异的荧光探针标准的 NIH-3T3 细胞 DNA 对照；（UNK 18S）带有 FAM-标记的 18S 基因特异的荧光探针标准的未知的转导 DNA 样品。

36. 在选好的工作区域放上干净的工作纸。
37. 用10%的漂白液清洗移液器、管架、冰盒和实验工作台。干燥15min。
38. 在设定的反应信息的基础上，计算整个定量分析所需试剂的体积。假定是1.15体积×样品数目（表3）。

**表3. 实时定量PCR样品的建立**

| 加入试剂的顺序 | 试剂 | 储存液的浓度 | 终浓度 | 体积/μl/反应 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 灭菌水 | — | — | 7.5 |
| 2 | TaqMan 通用混合液 | 2× | 1× | 12.5 |
| 3 | 上游引物 | 20mmol/L | 900nmol/L | 1.125 |
| 4 | 下游引物 | 20mmol/L | 900nmol/L | 1.125 |
| 5 | 荧光探针 | 10mmol/L | 50nmol/L | 0.25 |
| 6 | 靶基因 DNA 样品 | 5～20ng/μl | — | 2.5 |
| 总体积 | | | | 25 |

39. 更换手套和防护袖套。
40. 根据模板（步骤35）以及定量PCR仪器的不同，将管子放置于合适的PCR管托盘中。用新鲜的封口膜将管子封好。剪掉多余的两层封口膜。
41. 更换手套。
42. 将PCR混合母液、模板和荧光基因探针从－20℃冰箱中取出。冰上融化。
43. 更换手套。
44. 用PCR专用的移液器和枪头在冰上准备工作母液。将未用的储存液放回－20℃。
45. 更换工作服、手套和防护袖套。
46. 将PCR管托盘和PCR管盖移到单独的区域，加入DNA标准品和未知的样品DNA（从步骤34得到）。用带滤器的枪头加DNA，以避免交叉污染。
47. 当PCR管托盘的每一行都上样后，用新鲜的封口膜封住管子。

    用与准备混合母液相同的试剂准备非模板控制品（NTC）。
48. 更换手套和防护袖套。
49. 用另一套移液器将工作母液（从步骤44得到）加入到合适的反应管中。用光学盖子封住管子。
50. 用PCR管托盘放到定量PCR仪器中。开始以下的PCR反应：

    步骤1：50℃，2min。

    步骤2：95℃，10min。

    步骤3：95℃，15s，60℃，1min，循环40次。
51. 反应结束后，分析并保存数据以用于计算转导滴度。

    为了防止仪器和反应起始区域的污染，将反应管丢弃于远离定量PCR仪器的地方。
52. 计算每毫升转导单位（TU）的数量（表4）。

**表 4. 基于细胞系转化因子用于定量 PCR 的 DNA 的纳克数**

| | qPCR 实验所用的模板 DNA 的量 | | |
|---|---|---|---|
| 细胞系滴度 | 50ng | 25ng | 12.5ng |
| NIH-3T3 | 0.028 | 0.014 | 0.007 |

TU＝ng 检测到的目标序列×（1/97 500）×（6020/$10^{-8}$）×（扩增子质粒大小［kb］/150kb）

TU/ml＝（TU［上面所测的］/ng 最初测定的模板 DNA）×［（1000/μl 用来转导单层细胞）/细胞系转化因子］

## 参 考 文 献


Antonawich F.J., Federoff H.J., and Davis J.N. 1999. BCL-2 transduction, using a herpes simplex virus amplicon, protects hippocampal neurons from transient global ischemia. *Exp. Neurol.* **156:** 130–137.

Bowers W.J., Howard D.F., and Federoff H.J. 2000. Discordance between expression and genome transfer titering of HSV amplicon vectors: Recommendation for standardized enumeration. *Mol. Ther.* **1:** 294–299.

Bowers W.J., Howard D.F., Brooks A.I., Halterman M.W., and Federoff H.J. 2001. Expression of vhs and VP16 during HSV-1 helper virus-free amplicon packaging enhances titers. *Gene Ther.* **8:** 111–120.

Carew J.F., Federoff H., Halterman M., Kraus D.H., Savage H., Sacks P.G., Schantz S.P., Shah J.P., and Fong Y. 1998. Efficient gene transfer to human squamous cell carcinomas by the herpes simplex virus type 1 amplicon vector. *Am. J. Surg.* **176:** 404–408.

Chen X., Frisina R.D., Bowers W.J., Frisina D.R., and Federoff H.J. 2001. HSV amplicon-mediated neurotrophin-3 expression protects murine spiral ganglion neurons from cisplatin-induced damage. *Mol. Ther.* **3:** 958–963.

Coffin R.S., Thomas S.K., Thomas D.P., and Latchman D.S. 1998. The herpes simplex virus 2 kb latency associated transcript (LAT) leader sequence allows efficient expression of downstream proteins which is enhanced in neuronal cells: Possible function of LAT ORFs. *J. Gen. Virol.* **79:** 3019–3026.

D'Angelica M., Karpoff H., Halterman M., Ellis J., Klimstra D., Edelstein D., Brownlee M., Federoff H., and Fong Y. 1999. In vivo interleukin-2 gene therapy of established tumors with herpes simplex amplicon vectors. *Cancer Immunol. Immunother.* **47:** 265–271.

Federoff H.J. 1998. Replication-defective herpesvirus amplicon vectors and their use for gene transfer. In *Cells: A laboratory manual*, vol. 2. *Light microscopy and cell structure* (ed. D.L. Spector et al.), pp. 91.1–91.10. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Federoff H.J., Geschwind M.D., Geller A.I., and Kessler J.A. 1992. Expression of nerve growth factor in vivo, from a defective HSV-1 vector prevents effects of axotomy on sympathetic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 1636–1640.

Fong Y., Federoff H.J., Brownlee M., Blumberg D., Blumgart L.H., and Brennan M.F. 1995. Rapid and efficient gene transfer in human hepatocytes by herpes viral vectors. *Hepatology* **22:** 723–729.

Fraefel C., Jacoby D.R., Lage C., Hilderbrand H., Chou J.Y., Alt F.W., Breakefield X.O., and Majzoub J.A. 1997. Gene transfer into hepatocytes mediated by helper virus-free HSV/AAV hybrid vectors. *Mol. Med.* **3:** 813–825.

Freese A. and Geller A. 1991. Infection of cultured striatal neurons with a defective HSV-1 vector: Implications for gene therapy. *Nucleic Acids Res.* **19:** 7219–7223.

Geller A.I., During M.J., Oh Y.J., Freese A., and O'Malley K. 1995. An HSV-1 vector expressing tyrosine hydroxylase causes production and release of L-DOPA from cultured rat striatal cells. *J. Neurochem.* **64:** 487–496.

Geschwind M.D., Amat J., and Federoff H.J. 1993. Expression of BDNF in cultured neurons and non-neuronal cells from a defective HSV-1 vector. *Soc. Neurosci. Abstr.* **19:** 255.

Geschwind M.D., Kessler J.A., Geller A.I., and Federoff H.J. 1994. Transfer of the nerve growth factor gene into cell lines and cultured neurons using a defective herpes simplex virus vector. Transfer of the NGF gene into cells by a HSV-1 vector. *Mol. Brain Res.* **24:** 327–335.

Geschwind M.D., Hartnick C.J., Liu W., Amat J., Van De Water T.R., and Federoff H.J. 1996. Defective HSV-1 vector expressing BDNF in auditory ganglia elicits neurite outgrowth: Model for treatment of neuron loss following cochlear degeneration. *Hum. Gene Ther.* **7:** 173–182.

Halterman M.W., Miller C.C., and Federoff H.J. 1999. Hypoxia-inducible factor-1α mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J. Neurosci.* **19:** 6818–6824.

Jin B.K., Belloni M., Conti B., Federoff H.J., Starr R., Son J.H., Baker H., and Joh T.H. 1996. Prolonged *in vivo* gene expression driven by a tyrosine hydroxylase promoter in a defective herpes simplex virus amplicon vector. *Hum. Gene Ther.* **7:** 2015–2024.

Kutubuddin M., Federoff H.J., Challita-Eid P.M., Halterman M., Day B., Atkinson M., Planelles V., and Rosenblatt J.D. 1999. Eradication of pre-established lymphoma using herpes simplex virus amplicon vectors. *Blood* **93:** 643–654.

Lu B. and Federoff H.J. 1995. Herpes simplex virus type 1 amplicon vectors with glucocorticoid-inducible gene expression. *Hum. Gene Ther.* **6:** 421–430.

Lu B., Federoff H.J., Wang Y., Goldsmith L.A., and Scott G. 1997. Topical application of viral vectors for epidermal gene transfer. *J. Invest. Dermatol.* **108:** 803–808.

Oehmig A., Fraefel C., and Breakefield X.O. 2004. Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol. Ther.* **10:** 630–643.

Parry S., Holder J., Halterman M.W., Weitzman M.D., Davis A.R., Federoff H., and Strauss J.F., III. 1998. Transduction of human trophoblastic cells by replication-deficient recombinant viral vectors. Promoting cellular differentiation affects virus entry. *Am. J. Pathol.* **152:** 1521–1529.

Rajcani J. and Vojvodova A. 1998. The role of herpes simplex glycoproteins in the virus replication cycle. *Acta Virol.* **42:** 103–118.

Saeki Y., Breakefield X.O., and Chiocca E.A. 2003. Improved HSV-1 amplicon packaging system using ICP27-deleted, oversized HSV-1 BAC DNA. *Methods Mol. Med.* **76:** 51–60.

Saeki Y., Fraefel C., Ichikawa T., Breakefield X.O., and Chiocca E.A. 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol. Ther.* **3:** 591–601.

Stavropoulos T.A. and Strathdee C.A. 1998. An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J. Virol.* **72:** 7137–7143.

Tolba K.A., Bowers W.J., Hilchey S.P., Halterman M.W., Howard D.F., Giuliano R.E., Federoff H.J., and Rosenblatt J.D. 2001. Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98:** 287–295.

Wade-Martins R., Frampton J., and James M.R. 1999. Long-term stability of large insert genomic DNA episomal shuttle vectors in human cells. *Nucleic Acids Res.* **27:** 1674–1682.

Wade-Martins R., Saeki Y., and Chiocca E.A. 2003. Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells. *Mol. Ther.* **7:** 604–612.

Wade-Martins R., Smith E.R., Tyminski E., Chiocca E.A., and Saeki Y. 2001. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat. Biotechnol.* **19:** 1067–1070.

Willis R.A., Bowers W.J., Turner M.J., Fisher T.L., Abdul-Alim C.S., Howard D.F., Federoff H.J., Lord E.M., and Frelinger J.G. 2001. Dendritic cells transduced with HSV-1 amplicons expressing prostate-specific antigen generate antitumor immunity in mice. *Hum. Gene Ther.* **12:** 1867–1879.

Xu H., Federoff H.J., Maragos J., Parada L.F., and Kessler J.A. 1994. Viral transduction of *trk A* into cultured nodose and spinal motor neurons conveys NGF responsiveness. *Dev. Biol.* **163:** 152–161.

Yamada M., Oligino T., Mata M., Goss J.R., Glorioso J.C., and Fink D.J. 1999. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 4078–4083.

# 第二十二章　基于 γ-2 松猴疱疹病毒（HVS）的载体

Adrian Whitehouse
Institute of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, and Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, LS2 9JT, United Kingdom
禾立春和付超　译



## 摘要

松猴疱疹病毒（HVS）可以高效地感染多种人体细胞。它的基因组是环状、多拷贝的非整合游离基因，可以在细胞分裂的时候分离，产生子代病毒。这种特性使得基于 HVS 而构建的载体可以稳定转导处于分裂期的细胞群，且可以使导入的基因在体内或体外维持较长时期稳定地表达。此外，还可以在松猴疱疹病毒（HVS）基因组中插入细菌人工染色体（BAC）表达框，这简化了大片段异源性 DNA 的转导过程。这些特性相当于使人工染色体与一个高效的转染系统相结合。

## 引言

HVS 是典型的 γ-2 疱疹病毒或松猴疱疹病毒。它能持续感染其天然宿主——松猴，但是并不引起明显的病症。尽管当它感染美洲其他的灵长类动物时能引起白细胞增生，但这些病症可以因转化基因 *stp* 和 *tip* 的删除而完全消失（Fickenscher and Fleckenstein

2001)。这里提到的载体也删除了这些基因，因此不能转化任何类型的细胞。

HVS可以整合大片段的异源DNA，感染许多类型的人体细胞，其中包括肿瘤细胞和造血细胞（Grassmann and Fleckenstein 1989；Simmer et al. 1991；Stevenson et al. 1999，2000)。感染后，病毒基因组以游离体的形式持续存在，并稳定表达导入的异源基因（Grassmann and Fleckenstein 1989；Simmer et al. 1991；Stevenson et al. 1999，2000；Hall et al. 2000；Calderwood et al. 2004)。HVS游离体在宿主体内长时间的存在而不影响细胞的生长，这说明HVS游离体的存在并不破坏体外培养的人类细胞的生长机制（Smith et al. 2001)。而且在体外的肿瘤异种移植实验中发现，基于HVS的载体在异种移植体中保持潜伏状态，而不会扩散到其他的器官（Grassmann and Fleckenstein 1989；Simmer et al. 1991；Stevenson et al. 1999，2000；Hall et al. 2000；Calderwood et al. 2004)。HVS基因组作为一种游离的环状游离体，能在宿主体内长时间的存在，这就使得导入的异源基因能在体内高效且稳定地表达(Smith et al. 2001；Giles et al. 2003)。此外HVS可以通过直接注射，高效率地感染来源于多种人类肿瘤细胞的实体肿瘤异种移植体。在转染异种移植的肿瘤和球状培养物的实验中，基于HVS的载体都能稳定存在和表达异源基因（Smith et al. 2005)。通过全身感染，可以检测基于HVS的载体在体内的转化效率。实验结果表明基于HVS的载体可以感染多种小鼠组织，并维持一种持续的游离体感染，尤其是在肝脏中(Smith et al. 2005)。

HVS的基因组现在已经被克隆到细菌人工染色体中，这样便于对基于HVS的载体进行操作和生产。这种载体具有包装大片段的能力，因而能携带完整的顺式作用元件，使得组织特异性表达的治疗性基因甚至整个基因座能够正常表达。但是基于HVS的载体仍需进一步改进；目前还没有关于HVS引起的体液和细胞免疫反应方面的研究。尽管在免疫缺陷型的雌性BALB/c小鼠中，基于HVS的载体可以稳定存在并表达其携带的外源基因，但是在具有免疫能力的小鼠中，情况可能并非如此。另外，对于以治疗为目的的应用，还需要落实关于生物安全的多方面的因素。必须在这些载体中引入安全机制，包括复制缺陷型病毒及衣壳包装细胞依赖性的病毒等，以消除病毒复制的可能。本章中介绍的方法包括如何构建能表达异源目的基因的基于HVS的载体，及如何高效地纯化这些重组载体；另外也讨论了如何检测这些载体的感染效率和如何建立能使得HVS基因组作为游离体稳定存在的细胞株。

## 方案1

## 构建基于HVS的重组载体

为了在基于HVS的重组载体中插入异源基因片段并使其表达，必须构建一个重组的病毒载体。可利用HVS-BAC简化并增强重组病毒的构建（White et al. 2003；Smith et al. 2005b)，这需要两个步骤：首先将异源基因的表达框插入pHVS穿梭质粒中，然后再整合到HVS-BAC中（图1，见彩版)。

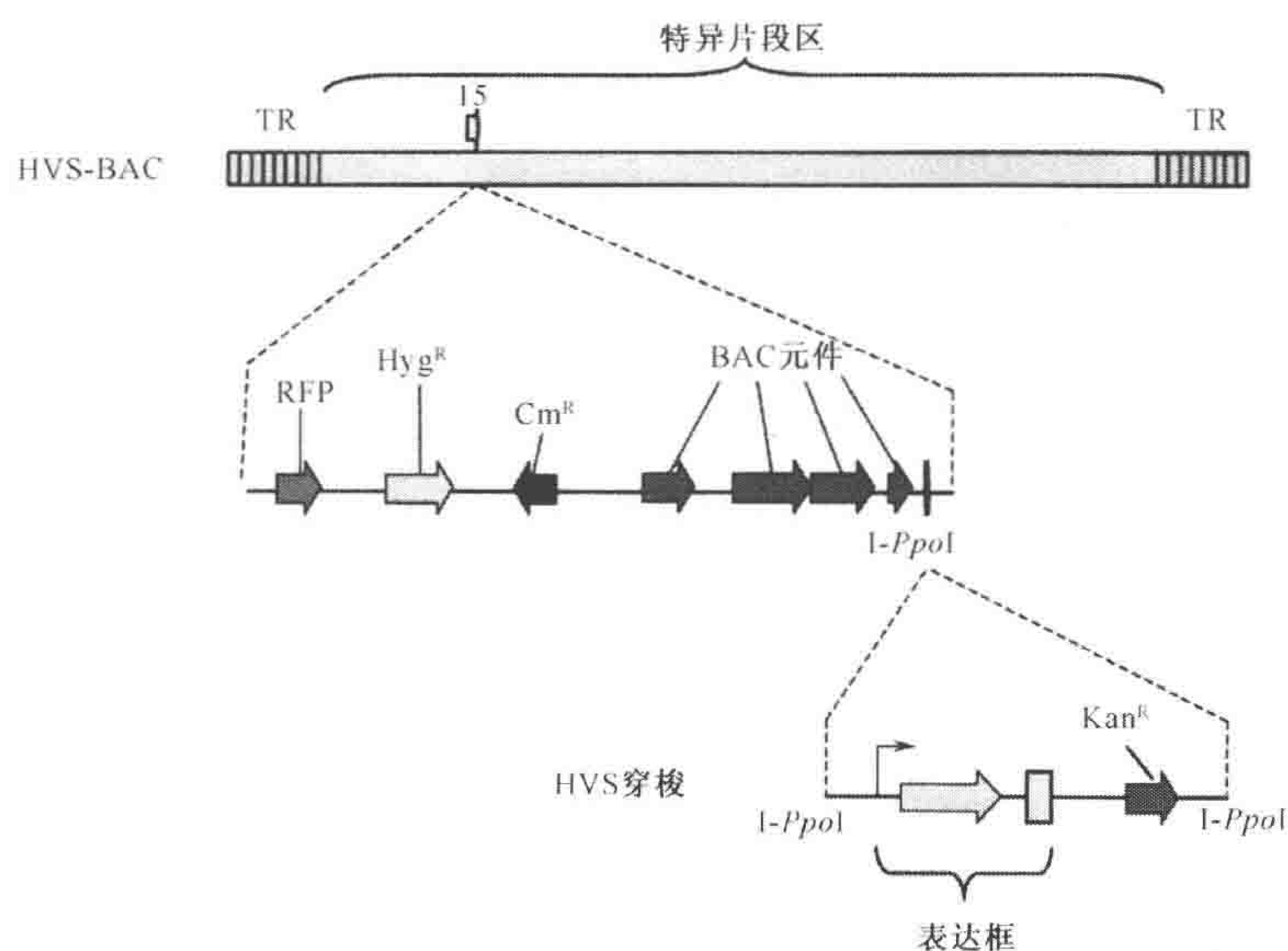



图 1. 利用 BAC 系统构建基于 HVS 的重组载体的示意图。将外源基因表达片段（包含合适的启动子、基因片段、多聚腺苷酸化信号）插入到 pHVS-shuttle 质粒中。用 I-*Ppo*I 酶切，将这个基因的表达框和卡那霉素抗性基因片段从 pHVS-shuttle 上分离出来，插入到 BAC 上单一的 I-*Ppo*I 酶切位点上。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

牛血清白蛋白（BSA；10%）

细胞：Electromax DH10 B 细胞（Invitrogen）；OMK 细胞

氯霉素（50μl/ml）< !>

DMEM 补充如下物质：

  2mmol/L 谷氨酰胺

  0.1%（*m/V*）碳酸氢钠< !>

  200U/ml 青霉素< !>

  200U/ml 链霉素< !>

胎牛血清（FBS）

葡萄糖（20%和 40% *m/V*）溶于 PBS 中

  以孔径为 0.2μm 的滤膜过滤。

*Ppo*I 限制酶和缓冲液（Promega）

卡那霉素（25μl/ml）< !>

Lipofectamine 2000（Invitrogen）

LB 培养基（pH 7.5）

1%（*m*/*V*）蛋白胨

0.5%（*m*/*V*）酵母提取物

0.5%（*m*/*V*）氯化钠

氯化镁（10mmol/L）<!>

PBS 缓冲液

质粒：HVS-BAC 和 pHVS-Shuttle

QIAquick 凝胶回收试剂盒

病毒悬浮缓冲液

　　100mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）<!>

　　50mmol/L NACl

　　10mmol/L EDTA

## 仪器

Beckman SW 27 离心机

烧瓶（75cm$^3$）

梯度混合器

LB 琼脂培养平板（14cm）

Maxiprep 柱（QIAGEN）

滚瓶

## 方法

1. 将外源基因表达片段（包含合适的启动子、基因片段、多聚腺苷酸化信号）插入到穿梭质粒 pHVS-Shuttle 中。
2. 用 I-*Ppo*I 酶切，将这个基因的表达框和卡那霉素抗性基因片段从 pHVS-Shuttle 上分离出来。

   I-*Ppo*I 酶切反应是在加入 1×BSA 和 10mmol/L $MgCl_2$ 的 1×I-*Ppo*I 酶切缓冲液中进行。
3. 依照产商说明书，用 QIAquick 凝胶回收试剂盒纯化目的片段。
4. 用 5～10μl 的 I-*Ppo*I 酶切使得 HVS-BAC 线性化。
5. 65℃处理 20min，热失活对穿梭质粒和 HVS-BAC 的酶切。
6. 将 HVS-BAC 的酶切产物在蒸馏水（$dH_2O$）中透析 2h。
7. 连接线性化的 HVS-BAC 和穿梭质粒片段，标准条件下 16℃连接过夜。

   3μl 的 HVS-BAC 与 1μl 的穿梭质粒酶切片段，在 10μl 的连接体系中进行连接，按照这样的比例通常可以得到较好的结果。具体的量可以根据提纯的 DNA 的质量和数量而定。
8. 将连接产物在蒸馏水（$dH_2O$）中透析 2h。
9. 用电穿孔法将无盐的连接产物导入到 20μl 的 Electromax DH10 B 菌体中。
10. 加入 400μl 的 LB 培养液，使菌体复苏。
11. 37℃下，摇晃（100r/min）孵育 1h。

12. 将电转导后的细胞涂在含有 LB 琼脂培养基、卡那霉素（50μg/ml）和氯霉素（25μg/ml）的平板（直径 14cm）上，过夜。
13. 按照产商提供的低拷贝质粒的提取方法，用 Maxiprep 柱从形成的菌落中提取和纯化重组的 HVS-BAC DNA。
14. 按照产商说明，用 Lipofectamine 2000 将 2μg 的纯化 HVS-BAC DNA 转入到 OMK 细胞中。
15. 将转染后的细胞在 DMEM 培养基中孵育 4～5d，直至出现明显的细胞毒性。
16. 使子代病毒释放到胞外的培养液中。

### 病毒工作储存液的生长

最适于 HVS 病毒裂解感染和生长的细胞系是在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养的 OMK 细胞。

17. 将 $1\times10^7$ 个细胞接种于 $75cm^3$ 的细胞培养瓶中，使细胞生长至汇合。
18. 在 5ml 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基中，以每个细胞 0.1 个蚀斑形成单位（0.1pfu/cell）的感染复数感染细胞。
19. 在 37℃感染 1h 后，吸出培养液。
20. 加入 10ml 含有 5% FBS 的 DMEM 培养基，在 37℃下培养 4～5d。
21. 当观察到出现细胞毒性时，释放子代病毒到胞外的培养液中。

    HVS 的工作储存液可以 $2\times10^6$～$2\times10^7$ pfu/ml 的最终浓度，在－70℃下长期保存。如仅需中期保存，HVS 能在 4℃保持稳定。

### 高滴度病毒的生长和纯化

22. 将约 $2\times10^8$ 个 OMK 细胞接种于滚瓶中，用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。
23. 以约 0.5pfu/个细胞的感染复数感染细胞。孵育 4～5d。
24. 分离细胞，收集细胞培养液。
25. 用带 Beckman SW27 转头的离心机，4℃下，将悬浮液于 20 000r/min 离心 90min。
26. 用病毒重悬缓冲液将沉淀重悬，每两个转瓶约使用 3ml 的重悬缓冲液。4℃下过夜。
27. 用梯度混合器，准备 20%～40%的葡萄糖浓度梯度。在浓度梯度中使重悬的病毒分层。
28. 用带 Beckman SW27 转头的离心机，4℃下，于 20 000r/min 离心 30min。
29. 收获中间的条带，这条带中包含约 90%的包装的病毒颗粒。
30. 用带 Beckman SW27 转头的离心机，4℃下，于 25 000r/min 离心 60min。用 PBS 重悬沉淀。

## 方案 2

# 用表达 HVS-GFP 的 HVS 病毒重组体检测 HVS 的感染效率

许多研究表明 HVS 能感染包括造血细胞和人类肿瘤细胞系在内的许多类型的人类细胞（Simmer et al. 1991；Stevenson et al. 1999，2000）。可以用能表达绿色荧光蛋白

（GFP）的 HVS 重组病毒（HVS-GFP）（Hall et al. 2003，White et al. 2003）来检测 HVS 对特定细胞系的感染效率（图 2，见彩版）。

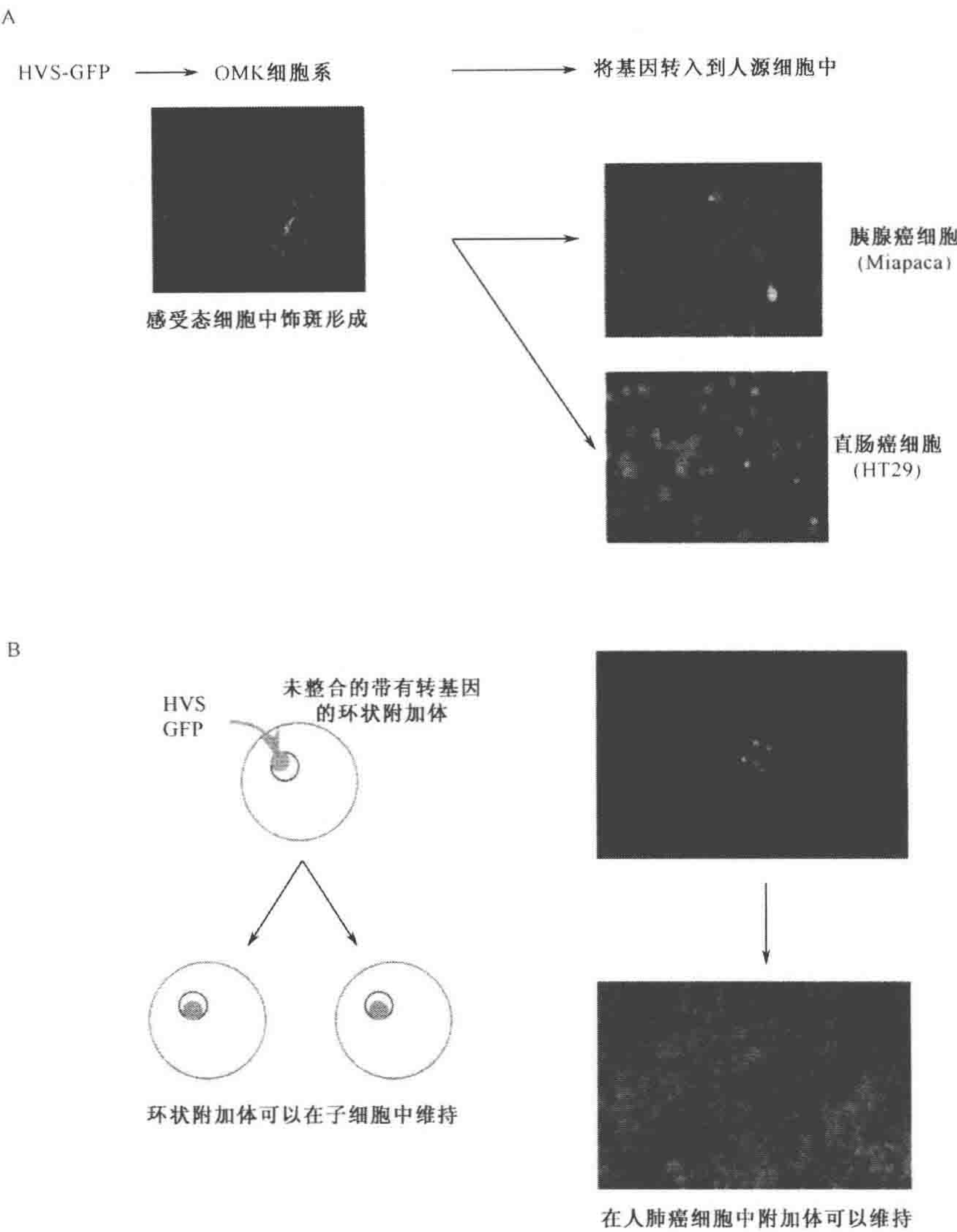



图 2. HVS-GFP 感染培养的细胞。A. HVS-GFP 感染 OMK 细胞后引起蚀斑的形成，OMK 细胞是能用来使病毒增殖的完全受纳细胞系。相反，对人直肠癌细胞（HT29）和胰腺癌细胞（Miapaca）的感染则是潜伏性感染，即病毒在这些细胞中以环状的游离的附加体形式存在。B. 构建 HVS-GFP 能在其中持续感染的人类肺癌细胞系 A549。用 HVS-GFP 感染 A549 细胞，然后用潮霉素筛选被感染了的细胞。图中所示为一个单菌落在 6 周内的生长情况。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

1. 细胞：目的细胞株
2. DMEM 培养基（Dulbecco's modified Eagle's medium）
3. 胎牛血清（FBS）
4. 潮霉素（250μl/ml；Invitrogen）< !>
5. 病毒：HVS-GFP

### 仪器

培养皿（35mm）
荧光显微镜

## 方法

1. 用 HVS-GFP 感染目的细胞株。

**感染贴壁的单层细胞**

a. 将 $5\times10^5$ 个目的细胞接种于 35mm 的培养皿，使其生长至 80%的汇合度。
b. 在 0.5ml 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基中，以 1 倍的感染复数感染细胞。
c. 37℃感染 1h。
d. 吸出培养液，换为含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。37℃下孵育。
e. 感染 24h 之后，在荧光显微镜下检测感染率。

**感染悬浮的细胞**

a. 在 0.5ml 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基中，将 $2\times10^5$ 个细胞与 10 倍感染复数的 HVS-GFP 混合。

应用离心法可以得到对悬浮细胞的高效感染。

b. 20℃下，1500r/min 离心悬浮液，促进细胞对病毒的吸收。
c. 以含有 10% FBS 的 DMEM 培养基清洗细胞。
d. 用 2ml 的 DMEM 培养基重悬沉淀，37℃下孵育。
e. 感染 24h 之后，在荧光显微镜下检测感染效率。

### 获得 HVS 稳定感染的细胞系

基于 HVS 的载体的主要优点之一在于它可以在分裂的细胞群中以游离的附加体形式稳定存在（Hall et al. 2003；White et al. 2003）。

2. 重复上述的单层和悬浮感染步骤，以建立稳定的长期感染的细胞株。
3. 感染 24h 之后，在培养基中加入 250μl/ml 的潮霉素，培养 2 周。其间每 4d 更换培

养基和潮霉素。

经过 2 周的培养，只有那些被成功转导了的细胞可以存活下来。

4. 在荧光显微镜下检测稳定转导细胞系的效率，应该 100％的细胞都可以表达绿色荧光蛋白（图 2B）。

## 方案 3

## Gardella 凝胶分析

利用 Gardella 凝胶分析可以检测 HVS 基因组是否维持在游离的附加体形式，这种方法可以区分整合到染色体中的病毒 DNA、游离的附加体病毒 DNA 以及线状的病毒 DNA，这三种形式的病毒 DNA 在胶上的位置分别为顶部、中间和底部。可以用基于聚合酶链反应（PCR）的 Gardella 凝胶分析，来检测宿主组织中的 HVS 附加体是否达到所需的灵敏度。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

琼脂胶

0.75％（*m*/*V*）琼脂胶，缓冲液为 TBE

0.8％（*m*/*V*）低熔点胶，缓冲液为 TBE，并加入 2％的 SDS<!>和 1mg/ml 自消化的链霉蛋白酶（Sigma-Aldrich）

PCR 引物

ORF73f（5′-CGCGGATCCATGGAAGCAGGACCAAGTACTCCA-3′）

ORF73r（5′-CCGCTCGAGCCTTCTATAGGCAGGCTTTTGCT-3′）

溶于 PBS 中的样品缓冲液

15％ 聚蔗糖

0.01％溴酚蓝<!>

TBE 缓冲液

89mmol/L Tris 碱<!>

2mmol/L EDTA

80mmol/L 硼酸<!>

#### 仪器

PCR 仪

Southern 印迹杂交的材料和试剂

## 方法

1. 两步配胶。
    a. 用 TBE 配置 0.75%的琼脂胶。
    b. 凝固后，去除上层 5cm 的胶。
    c. 代以含有 SDS 和链霉蛋白酶的 0.8%的琼脂胶。
2. 沉淀 $2\times10^6$ 个被感染的细胞，用 50μl 的样品缓冲液重悬。
3. 将样品加到胶孔中。
4. 4℃，40V 的电压下电泳 2h，之后在 160V 的电压下电泳 18h。
5. 用标准的 Southern blot 分析和适当的探针（如用$^{32}$P 标记的、HVS 的 *KpnE* 酶切片段特异性的随机引物扩增探针），鉴定附加体 DNA。

### 基于 PCR 的 Gardella 凝胶分析

6. 按上述步骤 1～4 处理样品。
7. 电泳结束后，将 Gardella 胶切成水平条。
8. 65℃下溶化琼脂胶。
9. 对每 5μl 的胶条做一次 PCR，以扩增 ORF73 片段，引物为 ORF73f 和 ORF73r。

## 致谢

感谢之前和现在的实验室成员及共同合作的同事与他们所做的科学上的贡献。本工作得到了 Biotechuology and Biological Sciences Research Council、Medical Research Council、Wellcome Trust、Candlelighters Trust、Yorkshire Cancer Research 和 Association of International Cancer Research 基金的资助。

## 参考文献

Albrecht J., Nicholas J., Biller D., Cameron K., Biesinger B., Newman C., Wittmann S., Craxton M., Coleman H., and Fleckenstein B. 1992. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.* **66:** 5047–5058.

Calderwood M.A., White R.E., and Whitehouse A. 2004. Development of herpesvirus-based episomally maintained gene delivery vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4:** 493–505.

Fickenscher H. and Fleckenstein B. 2001. Herpesvirus saimiri. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356:** 545–567.

Giles M.S., Smith P.G., Coletta P.L., Hall K.T., and Whitehouse A. 2003. The herpesvirus saimiri ORF 73 regulatory region provides long-term transgene expression in human carcinoma cell lines. *Cancer Gene Ther.* **10:** 49–56.

Grassmann R. and Fleckenstein B. 1989. Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J. Virol.* **63:** 1818–1821.

Hall K.T., Giles M.S., Goodwin D.J., Calderwood M.A., Carr I.M., Stevenson A.J., Markham A.F., and Whitehouse A. 2000. Analysis of gene expression in a human cell line stably transduced with herpesvirus saimiri. *J. Virol.* **74:** 7331–7337.

Simmer B., Alt M., Buckreus I., Berthold S., Fleckenstein B., Platzer E., and Grassmann R. 1991. Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines. *J. Gen. Virol.* **72:** 1953–1958.

Smith P.G., Coletta P.L., Markham A.F., and Whitehouse A. 2001. In vivo episomal maintenance of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector. *Gene Ther.* **8:** 1762–1769.

Smith P.G., Burchill S.A., Brooke D., Coletta P.L., and Whitehouse A. 2005a. Efficient infection and persistence of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector into human tumour xenografts and multicellular spheroid cultures. *Cancer Gene Ther.* **12:** 248–256.

Smith P.G., Oakley F., Fernandez M., Mann D.A., Lemoine N.R., and Whitehouse A. 2005b. Herpesvirus saimiri-based vector biodistribution using non-invasive optical imaging. *Gene Ther.* **12:** 1465–1476.

Stevenson A.J., Clarke D., Meredith D.M., Kinsey S.E., Whitehouse A., and Bonifer C. 2000. Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors maintain heterologous expression throughout mouse embryonic stem cell differentiation in vitro. *Gene Ther.* **7:** 464–471.

Stevenson A.J., Cooper M., Griffiths J.C., Gibson P.C., Whitehouse A., Jones E.F., Markham A.F., Kinsey S.E., and Meredith D.M. 1999. Assessment of herpesvirus saimiri as a potential human gene therapy vector. *J. Med. Virol.* **57:** 269–277.

White R.E., Calderwood M.A., and Whitehouse A. 2003. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J. Gen. Virol.* **84:** 3393–3403.

# 第二十三章　用 HSV /AAV 杂合扩增子载体递送基因

Okay Saydam，Daniel L. Glauser 和 Cornel Fraefel
Institute of Virology，University of Zurich，Switzerland
禾立春和付超　译



## 摘要

基于单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1）的扩增子载体具有亲代病毒的多种特性：广泛的宿主范围、可以感染分裂和非分裂的细胞、大的转基因容量等。这些特性使得其可携带基因组序列、cDNA 序列、较大的用于细胞特异性表达的转录调控序列、多个转基因盒，及来源于其他病毒的基因元件。杂合载体用来源于 HVS-1 的元件，使大片段的载体 DNA 能复制并包装成高感染力的颗粒，而用来源于其他病毒的元件，以增强载体 DNA 在被转导细胞中的稳定性。如腺相关病毒（AAV）具有将自身的基因组整合到人类第 19 号染色体上的独特能力。AAV 基因组侧翼的 *rep* 基因及末端反向重复序列（ITR）就足以完成这一整合过程。然而，基于 AAV 的载体转基因容量较小，且一般不含有 *rep* 基因以辅助完成特异位点上的基因整合。HSV/AAV 杂合载体既具有 HVS-1的复制和包装大片段基因的功能，又含有 AVV 病毒的 *rep* 基因和侧链末端反向重复序列（ITR）的转基因表达框。这就结合了 HVS-1 的大的转基因容量和 AAV 病毒所具有的特异位点上的转基因整合及持久稳定的转基因表达的能力。本章讲述了如何利用无辅助病毒包装体系来构建 HSV/AAV 杂合载体，同时也讨论了其与传统的 HVS-1 扩增子载体相比的优点和缺点。

## 引言

目前有两种不同的基于 HSV 的载体系统，重组型和扩增型。重组型的 HSV-1 载体是通过将转基因框插入到病毒的基因组中构建而成的，通常替换了一些病毒基因；扩

增型的 HSV-1 载体是包含有两个 HSV-1 顺式元件——DNA 复制起点（ori）和 DNA 包装/剪切信号（pac）-的细菌质粒，它不含有病毒基因（图 1A）。这两个元件就足以支持载体 DNA 的复制和在 HSV-1 辅助病毒功能存在的情况下将连接复制产物包装到病毒颗粒中。可以通过条件复制型 HSV-1 辅助病毒（Lim et al. 1996），以黏粒形式克隆而来的复制条件型/增殖型、包装缺陷型的 HSV-1 病毒基因组（Fraefel et al. 1996），或细菌人工染色体（Saeki et al. 1998，2001；Stavropoulos and Strathdee 1998）来实现辅助病毒的功能。扩增型载体具有大的转基因容量（多达 150kb），并且可以转导大部分分裂和不分裂的细胞类型（Wade-Martins et al. 2001，2003）。然而，大部分转基因的表达都是暂时性的（Oehmig et al. 2004），这与大多数与宿主内非整合型和非复制型的 DNA 载体的丢失有关。

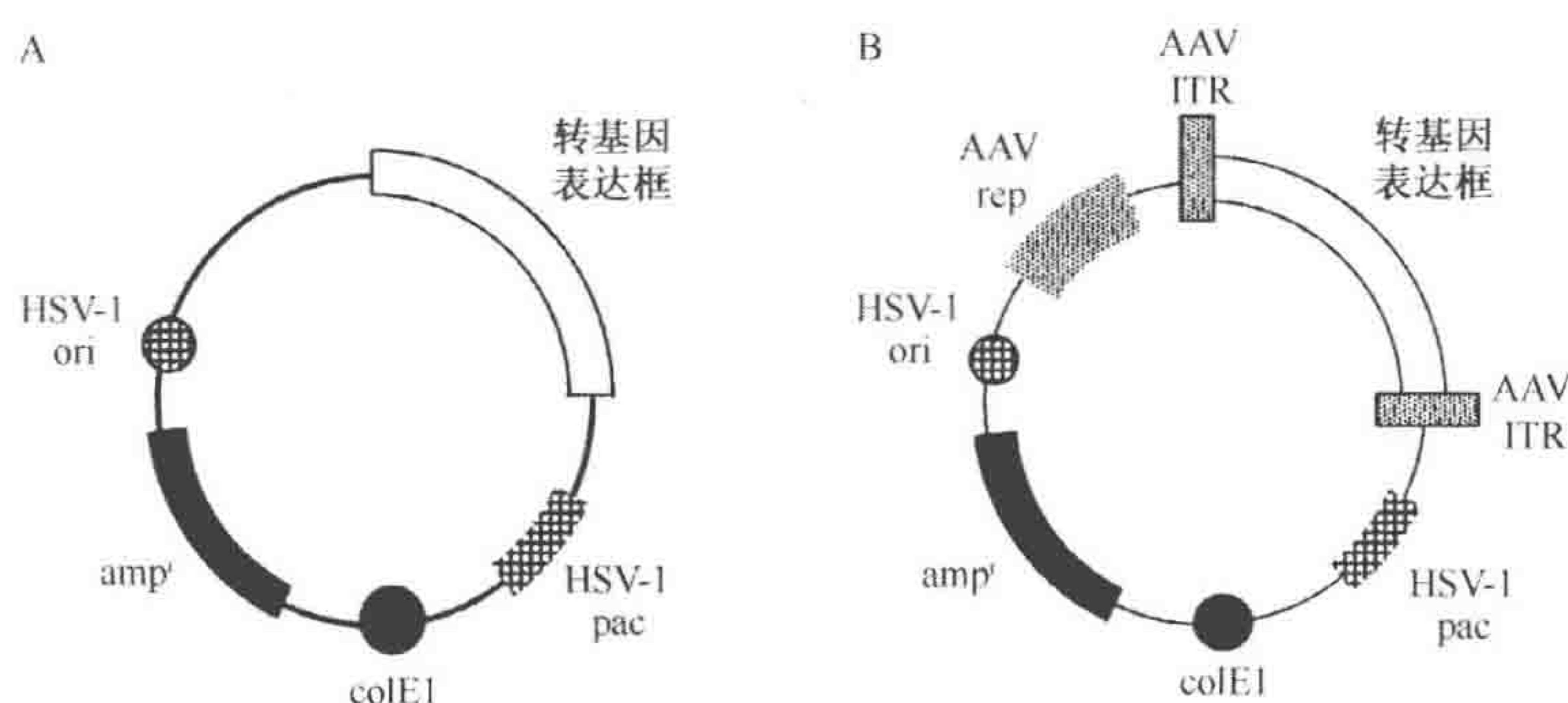



图 1. HSV-1 扩增载体（A）和 HSV/AAV 杂交载体（B）的示意图。HSV-1 扩增子载体含有一个抗性基因（amp$^r$）和一个细菌 DNA 复制起点，使得其能在大肠杆菌（*E. coli*）中扩增。它同时也携带一个转基因表达盒与两个 HSV-1 的顺式作用元件：DNA 复制起点（ori）和 DNA 包装/剪切信号（pac），从而使载体 DNA 能在有辅助病毒功能存在的情况下进行复制和包装。除了扩增载体的这些标准基因元件外，HSV/AVV 杂合载体还含有 AAV *rep* 基因和侧翼有 ITR 的转基因盒，以使转基因盒能在被转染细胞内整合到特定位点上。

野生型的 AAV 病毒基因组是线性的、单链 DNA，长度约 4680bp，在两个末端都有 145 个核苷酸大小的末端反向重复序列，其侧链有两个基因簇：*rep* 和 *cap*（Lusby et al. 1980；Srivastava et al. 1983）。这些末端反向重复序列包括 DNA 复制起点和包装信号。*rep* 基因依靠两个不同的启动子 p5 和 p19，编码 4 个表达框重叠的蛋白质，Rep78、Rep 68、Rep52 和 Rep40。ITR 和 Rep78 或 Rep68 就足以在有辅助病毒（如腺病毒或疱疹病毒）存在时完成 AAV 基因组的复制。没有辅助病毒存在时，ITR 和 Rep78 或 Rep68 足以介导 AAV 基因组整合到人类第 19 号染色体上被称为 AAVS1 的特异性位点上（Kotin et al. 1990；Linden et al. 1996）。

设计 HSV/AAV 杂合载体是希望将 HVS-1 大的转基因容量能力和 AAV 位点特异性基因整合和长期的基因表达的能力结合到一个质粒上。除了带有 HSV-1 的 ori 和 pac 元件外，HSV/AVV 杂合载体还含有 AAV 的 *rep* 基因和侧链 ITR 的转基因表达框（图 1B）。这些载体可以介导在 AAVS1 位点上的特异性整合，因而能使转基因在人类细胞中稳定表达（Heister et al. 2002；Wang et al. 2002）。然而，载体骨架上的 *rep* 基因可以抑制 HSV-1 复制，因此与标准的 HSV-1 扩增子载体或只含有侧链 ITR 的转基

因表达框而不含有 *rep* 基因的 HSV/AAV 杂合载体相比，*rep* 基因的存在大大降低了杂合载体储存液的滴度。本方案讲述了利用克隆到BAC上的复制条件型/增殖型、包装缺陷型的 HSV-1 病毒基因组提供载体复制和包装所需的辅助病毒功能，制备 HSV/AAV 杂交载体储存液的方法。同时也探讨了如何克服 AAV *rep* 基因表达对 HSV-1 复制的抑制的策略。

## 方案

# HSV/AAV 杂合扩增子载体的构建和包装

本方案使用的是删除了重要的即早期ICP27 基因和 pac 信号的 HSV-1 细菌人工染色体（fHSV$\Delta$pac$\Delta$27$\Delta$Kn），详见 Saeki 等（2001）。复制所必需的 ICP27 由另外的质粒（pEBHICP27）反式提供。对 HSV/AAV 杂合载体储存液制备和分析的概述见表 1。

**表 1．将 HSV/AAV 杂合扩增子包装进 HSV-1 颗粒**

| 天数 | 步骤 |
|---|---|
| 0 | 准备待转染的细胞 |
| 1 | 共转染 HSV-1 辅助病毒 DNA 和载体 DNA |
| 4 | 收获载体储存液，浓缩（可选），感染新细胞以备滴定 |
| 5 | 检测转基因表达，计数阳性细胞，计算滴定度 |

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞：Vero 细胞（clone 76，ECACC85020205）和 VERO 2-2 细胞（Smith et al. 1992）

干冰<!>

DMEM（Invitrogen）

乙醇<!>

胎牛血清（FBS 2%、6% 或 10%）

G418（Geneticin；Invitrogen，11811-031）<!>

HANK 缓冲液（HBSS；GIBCO-BRL）

Lipofectamine 试剂（Invitrogen）

质粒

- HSV/AVV 杂合扩增子质粒（pHSV/AAV；Heister et al. 2002）
- 包装缺陷型的 HSV-1 辅助病毒 DNA（Saeki et al. 2001）
  - fHSV$\Delta$pac$\Delta$27$\Delta$Kn
  - pEBHICP27

Opti-MEM1 (Invitrogen)

PBS 缓冲液

蔗糖

胰酶 (0.25%) <!>, EDTA (0.02%) (Invitrogen)

仪器

一次性注射器 (20ml)

血细胞计数板

孵育箱 (保湿, 37℃, 5% $CO_2$)

带探头的超声波破碎仪 (如 Sonifer 250; Branson)

注射器针头过滤器 (0.45mm, 聚醚砜膜; Sarstedt)

组织培养瓶 ($75cm^2$)

组织培养板 (直径 60mm)

超速离心机 (Sorvall SS-34 转头)

超纯离心管 (30ml, 25mm×89mm; Beckman)

## 方法

### 共转染包装缺陷型的 HSV-1 辅助病毒 DNA 与载体 DNA

HSV-1 扩增子及杂合扩增子是以细菌质粒为基础的,可以在 *E. coli* (图 1) 中构建和扩增 (Heister et al. 2002)。目的基因表达框可以通过传统的克隆步骤插入到 ITP 之间。

1. 准备待转染的 VERO2-2 细胞
   a. 用含有 500μg/ml G418 及含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 VERO2-2 细胞。每周传代两次,用 $75cm^2$ 组织培养瓶将细胞按 1∶5 的比例放置于 15ml 新鲜培养基中传代。
   b. 在转染的前一天,移去培养基,用 PBS 冲洗细胞两次。
   c. 加入 3ml 的胰酶/EDTA。将培养瓶于 37℃孵育 10min,使细胞脱壁。
   d. 用血细胞计数板进行细胞计数。每个直径 60mm 的培养板接种 $1.2\times10^6$ 个细胞于 3ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基中。
2. 为每个直径 60mm 的培养板准备两个加有 250μl Opti-MEM I 的 15ml 锥形管。
   a. 向其中一个锥形管中加入 0.5μg 的 pHSV/AAV、2μg 的 fHSVΔpacΔ27ΔKn 和 0.2μg 的 pEBHICP27。混匀并在室温下孵育 5min。

      也可以增殖型的、包装缺陷型的 HSV-1 黏粒 DNA 作 HSV-1 辅助病毒 DNA (Fraefel 1997)。

   b. 另一管中加入 16μl 的 Lipofectamine。混匀并在室温下孵育 5min。
3. 将上述两管混合。混匀后室温下放置 30min。
4. 向含有 DNA-Lipofectamine 转染混合物的管里加入 0.9ml 的 Opti-MEM I。

5. 用 2ml 的 Opti-MEM I 冲洗 VERO2-2 细胞培养物（见步骤 1）一次。

细胞在转染的时候应该处于汇合状态。

6. 将细胞培养液吸出，加入转染混合物。于 37℃，5% $CO_2$ 的孵育箱中孵育 4h。
7. 吸出转染混合物，用 2ml 的 Opti-MEM I 清洗细胞 3 次。
8. 加入 3.5ml 的含有 6% FBS 的 DMEM 培养基。在 37℃ 5% $CO_2$ 的孵育箱中孵育 2～3d。

## 收获包装的载体

9. 用橡胶细胞刮刀将细胞刮下。
10. 将悬液转移到 15ml 的锥形管中。将锥形管放置于加有冰水的冰槽中。
11. 将超声波破碎仪的探头置于细胞悬液液面下约 0.5cm。用 20%的输出功率（55W）超声破碎 20min。
12. 4℃，1400*g* 离心 10min，除去细胞碎片。
13. 用连在 20ml 一次性注射器上的 0.45μm 注射器针头过滤器，将上一步得到的上清液过滤到新的 15ml 锥形管中。
14. 取出一份样品用于测定滴度（步骤 19），其余的分装为每份 1ml 的若干份。
15. 将分装的样品置于干冰/乙醇中。于－80℃保存。

也可以在冻存之前先将样品浓缩（步骤见下）。载体可在－80℃下至少保存 6 个月而不影响滴度。

16. 按下面的步骤浓缩样品。
    a. 将步骤 14 所得载体溶液转移到含有 25% 蔗糖的 HBSS 的 30ml 离心管中。
    b. 用 Sorvall SS-34 转头，16℃，20 000r/min 离心 2h。
    c. 将所得沉淀重悬于约 300μl 的 HBSS 中。
    d. 取出一部分样品测定滴度（步骤 19），将其余的分装为每份 30μl 的若干份。
    e. 于干冰/乙醇中冰冻，－80℃保存。

## 扩增子储存液的滴定

为了检测扩增子储存液中感染性质粒的浓度，用这些扩增子去感染细胞。24～48h 后，计数表达转基因的细胞以计算滴度，用每毫升中含有的转导单位表示。

17. 将 VERO76 细胞以每孔 $1\times10^5$ 个细胞的浓度，接种到 24 孔板中，每孔中加有 0.5ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基。在 37℃，5% $CO_2$ 的孵育箱中孵育过夜。
18. 吸出培养液，用 PBS 清洗每孔。
19. 分别将 0.1μl、1μl、5μl 的质粒储存液稀释到 250μl 含 2% FBS 的 DMEM 培养基中，然后加到细胞中。
20. 在 37℃，5% $CO_2$ 的孵育箱中孵育 1～2d。
21. 用合适的方法检测转基因的表达量（如绿色荧光蛋白、免疫细胞化学染色、X-gal 染色）。
22. 计数表达呈阳性的细胞，用转基因表达阳性的细胞数乘上稀释的倍数以计算载体的滴度（TU/ml）。

在感染 HSV/AAV 杂合载体的人类细胞中，鉴定载体序列和 AAVS1 序列之间特定性位点

整合和连接的方法请参照其他资料（Heister et al. 2002；Wang et al. 2002）。

## 致谢

作者得到了 Julius-Muller Foundation、the Swiss National Science Foundation（Grant No. 3100A0-100195）和 Cancer League of Kanton Zurich 的支持。

## 参考文献

Fraefel C. 1997. Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. In *Current protocols in neuroscience* (ed. J.N. Crawley et al.), pp. 4.14.5–4.14.8. Wiley, New York.

Fraefel C., Song S., Lim F., Lang P., Yu L., Wang Y., Wild P., and Geller A.I. 1996. Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* **10:** 7190–7197.

Heister T., Heid I., Ackermann M., and Fraefel C. 2002. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J. Virol.* **76:** 7163–7173.

Kotin R.M., Siniscalco, M.R., Samulski J., Zhu X.D., Hunter L., Laughlin C.A., McLaughlin S., Muzyczka N., Rocchi M., and Berns K.I. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87:** 2211–2215.

Lim F., Hartley D., Starr P., Lang P., Song S., Yu L., Wang Y., and Geller A.I. 1996. Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* **3:** 460–469.

Linden R.M., Winocour E., and Berns K.I. 1996. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 7966–7972.

Lusby E., Fife K.H., and Berns K.I. 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **34:** 402–409.

Oehmig A., Fraefel C., Breakefield X.O., and Ackermann M. 2004. Herpes simplex virus type 1 amplicons and their hybrid virus partners, EBV, AAV, and retrovirus. *Curr. Gene Ther.* **4:** 385–408.

Saeki Y., Fraefel C., Ichikawa T., Breakefield X.O., and Chiocca E.A. 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol. Ther.* **3:** 591–601.

Saeki Y., Ichikawa T., Saeki A., Chiocca E.A., Tobler K., Ackermann M., Breakefield X.O., and Fraefel C. 1998. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: Rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2787–2794.

Smith I.L., Hardwicke M.A., and Sandri-Goldin R.M. 1992. Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* **186:** 74–86.

Srivastava A., Lusby E.A., and Berns K.I. 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45:** 555–564.

Stavropoulos T.A. and Strathdee C.A. 1998. An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J. Virol.* **9:** 7137–7143.

Wade-Martins R., Saeki Y., and Chiocca E.A. 2003. Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells. *Mol. Ther.* **7:** 604–612.

Wade-Martins R., Smith E.R., Tyminski E., Chiocca E.A., and Saeki Y. 2001. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat. Biotechnol.* **19:** 1067–1070.

Wang Y., Camp S.M., Niwano M., Shen X., Bakowska J.C., Breakefield X.O., and Allen P.D. 2002. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus $rep^+$ hybrid amplicon vector improves the stability of transgene expression in human cells by site-specific integration. *J. Virol.* **76:** 7150–7162.

# 第二十四章　多瘤病毒：SV40

David S. Strayer，Christine Mitchell，Dawn A. Maier 和 Carmen N. Nichols
Department of Pathology，Jefferson Medical College，Philadelphia，Pennsylvania 19107
叶文彬和付超　译



## 摘要

重组的猿猴病毒 40（rSV40）的衍生载体对骨髓原始细胞（bone marrow progenitor cell）及其分化细胞、某些类型的上皮细胞（如肝细胞）和中枢神经系统神经元和小胶质细胞（microglia）的基因投递十分重要。它们能在体内或体外的静止细胞或分裂细胞中迅速地整合到细胞 DNA 内，并产生长期的基因表达。本章介绍用于提取、纯化载体及对这些载体进行定量的相关技术。这些过程只需要包装细胞（如 COS-7）和环状载体基因组 DNA。用到的唯一特殊设备是滴定所需的实时定量聚合酶链反应（PCR）仪。用载体反复转染包装细胞，从而达到扩增的目的。整个过程不需要用到共转染。用非连续蔗糖或氯化铯梯度离心来提纯病毒，然后用定量 PCR 进行滴定。得到的载体是复制缺陷型的，并且不存在可探测的野生型 SV40 回复突变体。这些方法很简单，可重复，能够生成敲除 Tag 序列或所有 SV40-编码序列、能携带 5kb 外源 DNA 的载体。可以很容易地得到感染率超过 $10^{10}$ 单位/ml 的载体。这些载体适用于长期表达由哺乳动物细胞或感染哺乳动物细胞的病毒编码的蛋白质或非翻译的 RNA（如 RNA 干扰）。前面提到的技术促进了这些载体的应用，使得几乎任何一个实验室都可以竭尽所能进行基因传递应用方面的研究。

## 引言

SV40 是一种具有 5.25kb 的双链环状 DNA 基因组的多瘤病毒（图 1）。它携带三个

结构基因（VP1、VP2、VP3）和编码大T抗原（Tag）和小T抗原（tag）的两个主要调控基因。野生型SV40通过它的受体［根据不同的报道为I型主组织相容性复合体（Breau et al. 1992；Stang et al. 1997）或神经节苷脂GM1（Tsai et al. 2003）］感染很多种哺乳动物细胞。SV40通过脂筏进入细胞，脂筏将其传递到微管传送系统，从而使病毒体被运输到细胞核（Pelkmans et al. 2001，2002）。在进入细胞的过程中没有经过细胞质阶段。病毒抗原直到在基因组复制后才被合成，之前不会受到处理。

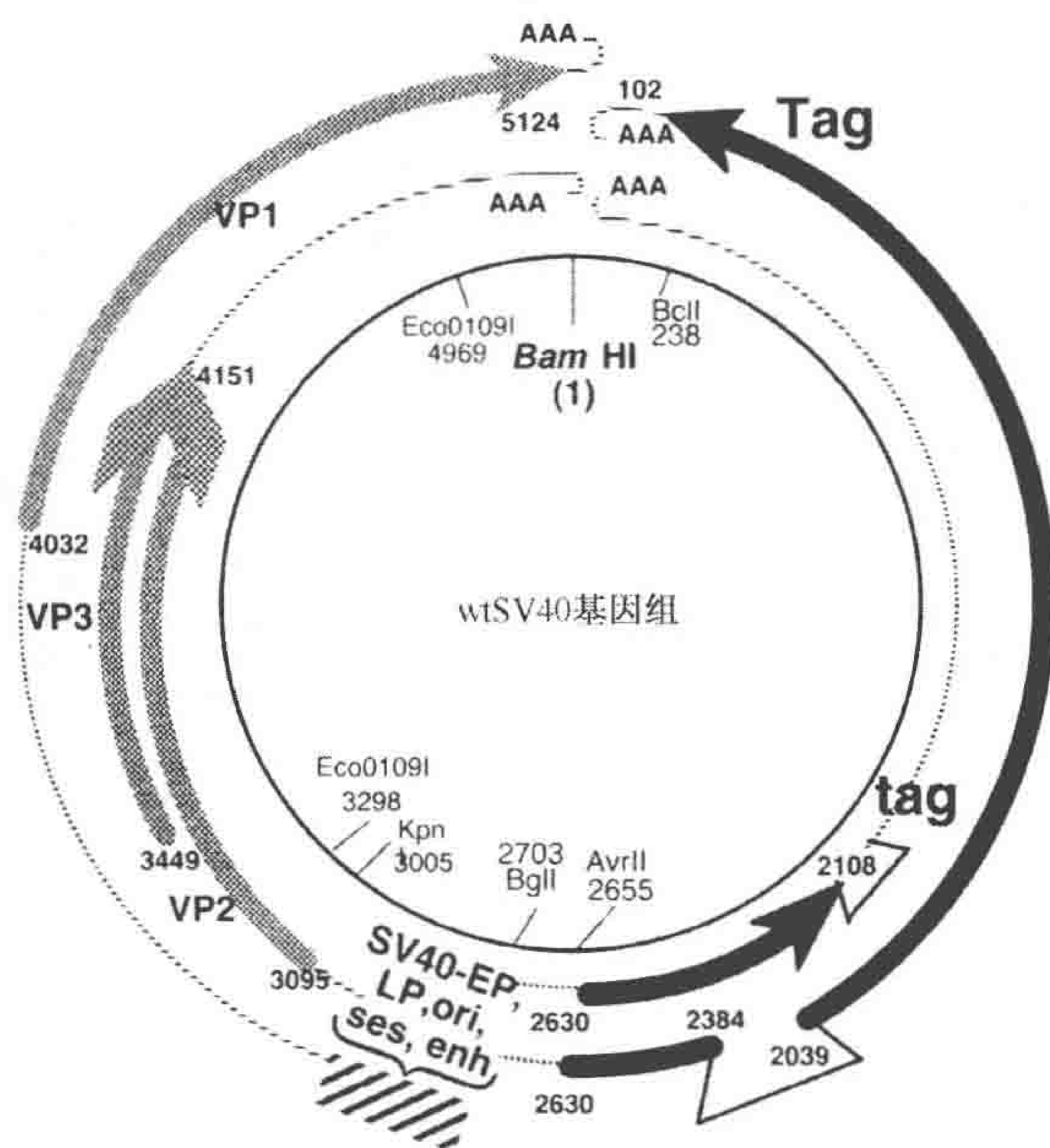



图1. 野生型SV40转录图谱。SV40基因组为5.25kb的双链DNA。早期和晚期重要的转录本如图所示。按照需要，我们定义SV40上唯一的*Bam*HI位点为原点。早期的转录按逆时针方向进行，晚期的转录是在相反的链上顺时针方向进行的。调控序列包括早期启动子（EP）和晚期启动子（LP）、包装序列（ses）、病毒基因组复制起点（ori）和增强子序列（enh）。早期和晚期mRNA的多聚腺苷酸位点都在*Bam*HI位点附近。（引自 Fired and Prives 1986；Cole and Conzen 2001）

要构建一个rSV40基因传递载体，要切除Tag基因。Tag对于病毒DNA复制和晚期基因（也就是结构基因）表达是必需的。删除编码Tag的基因就意味着产生的病毒只有在反式表达Tag的细胞内才能复制。可插入长达3kb的外源DNA替换Tag，如额外的聚合酶II（pol II）或pol III启动子和转基因编码序列（图2）。SV40-EP可以通过插入多聚腺苷酸信号来阻断。通过使用同样表达SV40壳体蛋白的包装细胞，可以删除更多的基因组来容纳更大的转基因片段。一个最小的rSV40载体只需要携带SV40复制起点和包装序列（图2）。尽管如此，通常还是保留SV40 pA和其他非翻译序列。表1列出这些作为基因传递工具的载体的主要特征及其限制。

基因传递效率和转化细胞内转基因的表达水平通常随使用的rSV40剂量的增加而增加，在体外和体内实验中均是如此。通过增加一次感染过程的感染复数来提高传递效

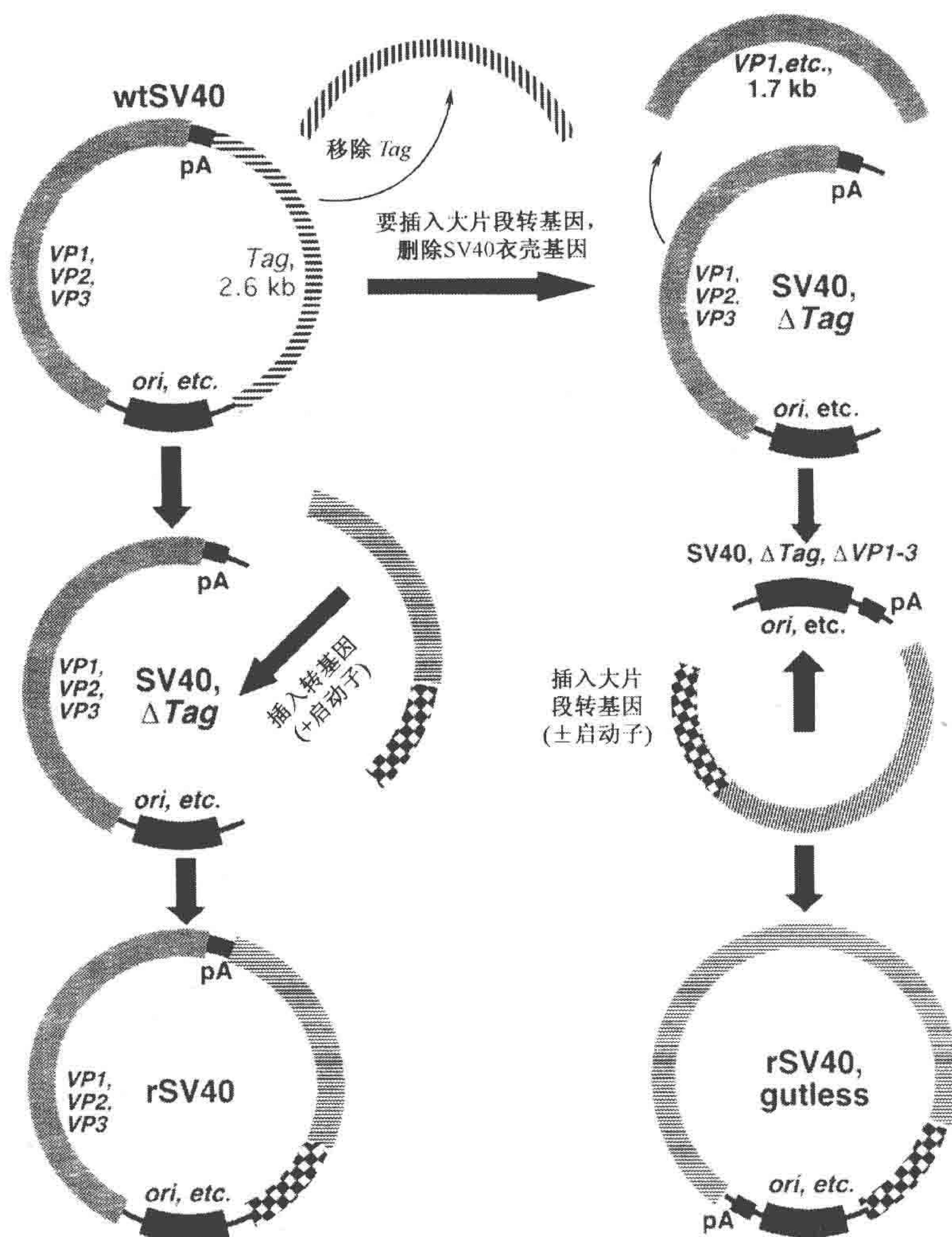



图 2. 构建 rSV40 载体和无病毒基因的 rSV40 载体。从一个克隆得到的野生型 SV40 基因组开始（左上，载体质粒没有画出），Tag 和 *tag* 基因（2.6kb）被切除，而保留了 SV40 壳体基因和多聚腺苷酸信号（pA），以及 SV40 复制起点 ori、装配信号（ses）、增强子和早期启动子（它与 ori 重合，所以无法切除）。长度小于 3kb 的转基因（包含一个附加的启动子，如 CMV-IEP）可以直接克隆到这个 Tag-缺陷的基因组（左中），产生一个包含转基因、SV40 壳体基因和附加启动子的 rSV40。为了容纳更长的插入序列，SV40 壳体基因也可以被切除（右上），而保留 *ori*、*ses*、启动子和 pA（右中）。更长的转基因（启动子可有可无，根据需要而定）就可以克隆到这个“无病毒基因的”骨架中，产生一个不含所有 SV40 编码序列的 rSV40。

率，效果不如增加感染次数那样显著。许多组织和细胞的体内和体外实验都表明，通过三次连续处理，使用 rSV40 可以达到大于 95%的转化效率，相当于以 10～16 的累积感染复数感染（Sauter et al. 2000；Strayer et al. 2002）。

**表 1. SV40 衍生载体的主要特征**

| 特性 | 典型 rSV40 特征 |
| --- | --- |
| 滴定 | 通常感染颗粒 $10^{11}$～$10^{12}$个/ml |
| 转基因表达时效 | 一旦建立，转基因表达永久保持 |
| 基因传递效率 | 体外：不加选择，通常＞98％ |
| | 体内：在稀疏组织（如肝组织），＞90％细胞可被转化 |
| 最大插入片段大小 | 最大 5kb |
| 靶细胞嗜性 | 几乎能转化所有静止细胞和分裂细胞 |
| 将抗原性传递(imparted)给靶细胞 | 至今未观察到 |
| 中和抗体 | 至今未观察到 |
| "无病毒基因的"载体 | 和携带病毒基因的载体的产生完全相同，产量也相当于那些携带病毒基因的载体 |
| 抗逆性 | 非常稳定，干粉状态可以在 4℃甚至室温长期保存 |
| 使用的启动子 | 组成性的 pol II、pol III 启动子；有条件的 pol III 启动子 |
| 表达的转基因 | 几乎所有的哺乳动物 cDNA；哺乳动物病毒的 cDNA |
| 局限性 | 非哺乳动物的标记基因一般不表达（如 GFP 和 β-半乳糖苷酶） |
| | 蛋白质表达水平一般低于许多其他载体系统 |

## 方案 1

# 构建 SV40 衍生载体

许多不同的技术被用于构建具有不同特性的 rSV40 载体（Gething and Sambrok 1981；Asano et al. 1985；Strayer 1996，1999；Strayer and Milano 1996；Rund et al. 1998；Strayer et al. 2001；Vera et al. 2004）。简而言之，通过前面提到的方法（Strayer 1999；Strayer et al. 2002）提取的 rSV40 基因组都是在能反式提供删除了的 SV40 基因（通常是 Tag）的 COS-7 细胞（或其他细胞系）中包装的。因为天然的 SV40DNA 是环状的，从载体质粒中切除出来的载体基因组，在转染到包装细胞之前必须重新环化。使用氯化铯梯度超速离心法提纯载体。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

COS-7 细胞（ATCC）

在 75cm² 的细胞培养瓶中用 DMEM-10 培养细胞，每 3～4d 传代一次。

氯化铯梯度溶液（1.28g/ml 和 1.50g/ml）＜!＞

分别将 30g 和 40g 固体 CsCl 溶解于 70ml 和 50ml 的 0.02mol/L Tris-HCl（pH 7.4）中。分别取 1ml 的每种溶液，用分析天平称重确定密度。使用 0.22μl 滤膜过滤灭菌。

双去污剂

5% 去胆酸盐（Sigma-Aldrich）<!>

10% Triton X-100（Sigma-Aldrich）<!>

Dulbecco 基本培养基（DMEM；GIBCO-BRL）

使用 0.22μm 滤膜过滤灭菌。

乙醇（70% $V/V$）<!>

FuGENE-6 转染试剂（Roche）

生长培养基（pH 7.4）（DMEM-10）

DMEM

10% 正常小牛血清（Cambrex）<!>

1%青霉素/链霉素（Cellgro）<!>

1% L-谷氨酸（Cellgro）

使用 0.22μm 滤膜过滤灭菌。

维持培养基（pH 7.4）（DMEM-2）

DMEM

2% 正常小牛血清（Cambrex）<!>

1% 青霉素/链霉素（Cellgro）<!>

1% L-谷氨酸（Cellgro）

使用 0.22μm 滤膜过滤灭菌。

10×磷酸盐缓冲液（PBS）

2g KCl<!>

80g NaCl

14.4g $Na_2HPO_4$<!>

2.4g $KH_2PO_4$<!>

溶解于 1L 双蒸水（$ddH_2O$）。使用前，用双蒸水将 10×储液稀释成 1×PBS。调整 pH 为 7.4。使用 0.22μm 滤膜过滤灭菌。

rSV40 DNA

包含所需转基因的病毒基因组 DNA 从载体质粒中切除得到，胶纯化，然后使用标准技术重新环化。

胰酶/EDTA（Cellgro）<!>

水，双蒸水

## 仪器

细胞刮刀（灭菌，单独包装）

离心管（塑料，清洁，且透明；Beckman）

使用前，室温下使用 70%乙醇浸泡离心管至少 15min 灭菌。

$CO_2$ 培养箱（维持 37℃，5%～6% $CO_2$；NAPCO）

冻存管（1.5ml；Nalgene）

透析浮标和透析卡（0.5～3.0ml；Pierce）

Eppendorf 管（1.5ml）
冰箱（−80℃；Revco）
无菌层流操作台
显微镜（明场）
针头（18 号，灭菌，单独包装）
微量移液器（灭菌，单独包装，2ml、5ml 和 10ml；Fisher）
移液器（10ml、100ml 和 1000ml；Ranin）
注射器（3.0ml 和 5.0ml，灭菌）
组织培养皿（100mm；Corning）
组织培养瓶（$75cm^2$；Corning）
超速离心机（Beckman）带 SW 28.1 转子和配套容量桶（bucket）

使用前 SW 28.1 和容量桶要高压灭菌。

涡旋混合器
恒温水浴超声破碎仪

## 方法

1. 转染前一天，从已汇合的两瓶 COS-7 细胞中吸出 DMEM-10 培养液。用 1ml PBS 清洗。

   这里使用的体积是针对 100mm 培养皿。更小或更大的样品根据数量做相应调整(表 2)。

**表 2. 转染条件**

| 培养皿/mm | DNA/μg * | DMEM/μl * | lipid/μl * |
| --- | --- | --- | --- |
| 60 | 1～5 | 200 | 3～15 |
| 100 | 8～12 | 500 | 24～36 |
| 150 | 15～20 | 800 | 45～60 |

* 表示每个培养皿。

2. 吸出 PBS。加入 1ml 胰酶/EDTA。
3. 37℃孵育 1min 或直到细胞开始从瓶底脱落。

   在明视野显微镜下观察细胞的状态。

4. 一旦细胞脱落后，各个培养瓶中加入 10ml DMEM-10。将细胞悬液转移到一个瓶中。
5. 将悬浮的细胞转移到 8 个 100mm 组织培养皿中。37℃，5% $CO_2$ 培养过夜。

   细胞在转染前应当有 60%～80%的汇合度。

6. 吸去培养液。加 8ml DMEM-2 到每个盘中。放回培养箱中。
7. 准备转染试剂，每个盘使用单独的 Eppendorf 管。
   a. 每个 1.5ml 管中加入 500μl DMEM（无血清、抗生素、谷氨酸盐）。
   b. 每管中加入 30μl FuGENE。轻轻吹打混合均匀。

      直接把 Fugene 加入到 DMEM 中，避免接触到管壁。

   c. 其中 6 管中每管加入 10μg rSV40 DNA。轻轻吹打混合均匀。

第 7 管（不加 DNA）作为阴性对照。第 8 管中加入 10μg 表达对照的质粒 DNA（如表达增强绿色荧光蛋白）作为阳性对照。

d. 室温孵育约 20min。

8. 将组织培养皿从培养箱中取出。一滴一滴地加入 lipid/DNA 混合物到每个盘中。晃动培养皿使试剂分散均匀。
9. 将培养皿放回培养箱，37℃ 5% $CO_2$ 培养 72h。

   48h 后，检查阳性和阴性对照，观察细胞毒性和转染效率。

10. 转染后 72h，轻轻将细胞刮到细胞培养液中。

    每个培养皿要使用单独分装的无菌细胞刮刀。

11. 将细胞溶液转移到 15ml 或 50ml（取决于总体积）锥底离心管中。轻轻吹打细胞，使成团细胞分散开来。
12. −80℃冷冻，然后室温解冻 3 次。
13. 在水浴超声破碎仪中超声裂解细胞。

    裂解液可以在−80℃中保存几个月

14. 每 10ml 裂解液中加入 1ml 双重去污剂。涡旋混合。冰上孵育 15min。
15. 将裂解液转移到离心管中。将离心管放到 SW 28 桶中。

    使用 DMEM 平衡各管。尽管桶只用到部分，但是桶里所有管都要离心。空桶要用水来平衡。

16. 4℃，16 000*g* 离心 20min 除去细胞碎片。
17. 转移上清到 15ml 锥底离心管。弃去沉淀。使用 DMEM 调整体积到 13ml。
18. 加入 2.5ml 1.28g/ml CsCl 溶液到干净的塑料管中。再加入 1.5ml 1.50g/ml CsCl 溶液。
19. 小心地把前面得到的 13ml 上清加到 CsCl 溶液里。避免混合各层溶液。
20. 将管放到桶里。按步骤 15 平衡。4℃，22 500r/min 离心 3.5h。
21. 使用 18 号针插入到每管的底部。
22. 收集 0.5ml 层分到 Eppendorf 管中。

    病毒离心后，大部分位于两种 CsCl 溶液的交界面处，应该是第 3～6 层。当这一交界面达到管底时会出现明显的流速改变。

23. 收集含有病毒的层分，以及前一层的层分和后一层的层分。
24. 使用 Pierce 0.5～3ml 透析盒在 PBS 中透析收集到的病毒 3 次。

    每轮透析时，1ml 透析样品使用 1L PBS。

## 方案 2

## 滴定复制缺陷型的 rSV40

尽管野生型 SV40 通常在猴细胞中使用琼脂糖凝胶空斑滴定技术（Rosenberg et al. 1981）进行滴定，但是这个方法不适合 rSV40 载体，因为它需要几个星期，太繁琐，而且不能给出可重复的滴定量。取而代之的是，复制缺陷的 rSV40 病毒可以用定量 PCR（qPCR）来滴定。qPCR 使用 rSV40 特异性的引物，测量在纯化的病毒中 rSV40

基因组的数量，并用 SYBR Green 对 PCR 产物进行检测。SYBR Green 和双链 DNA 结合时会产生强烈的荧光，并且荧光强度和双链 DNA 的浓度呈正比。在 PCR 复性和延伸阶段测定这个荧光信号。测量的结果用实时扩增图显示出来（图 3）。循环阈值（$C_t$）是扩增的荧光信号开始明显大于背景时的第一个循环数（表 3）。初始模板浓度越高则荧光信号超过背景所需要的循环数越少。通过和 rSV40 质粒 DNA 的标准曲线进行比较，来确定病毒滴定度（图 4）。

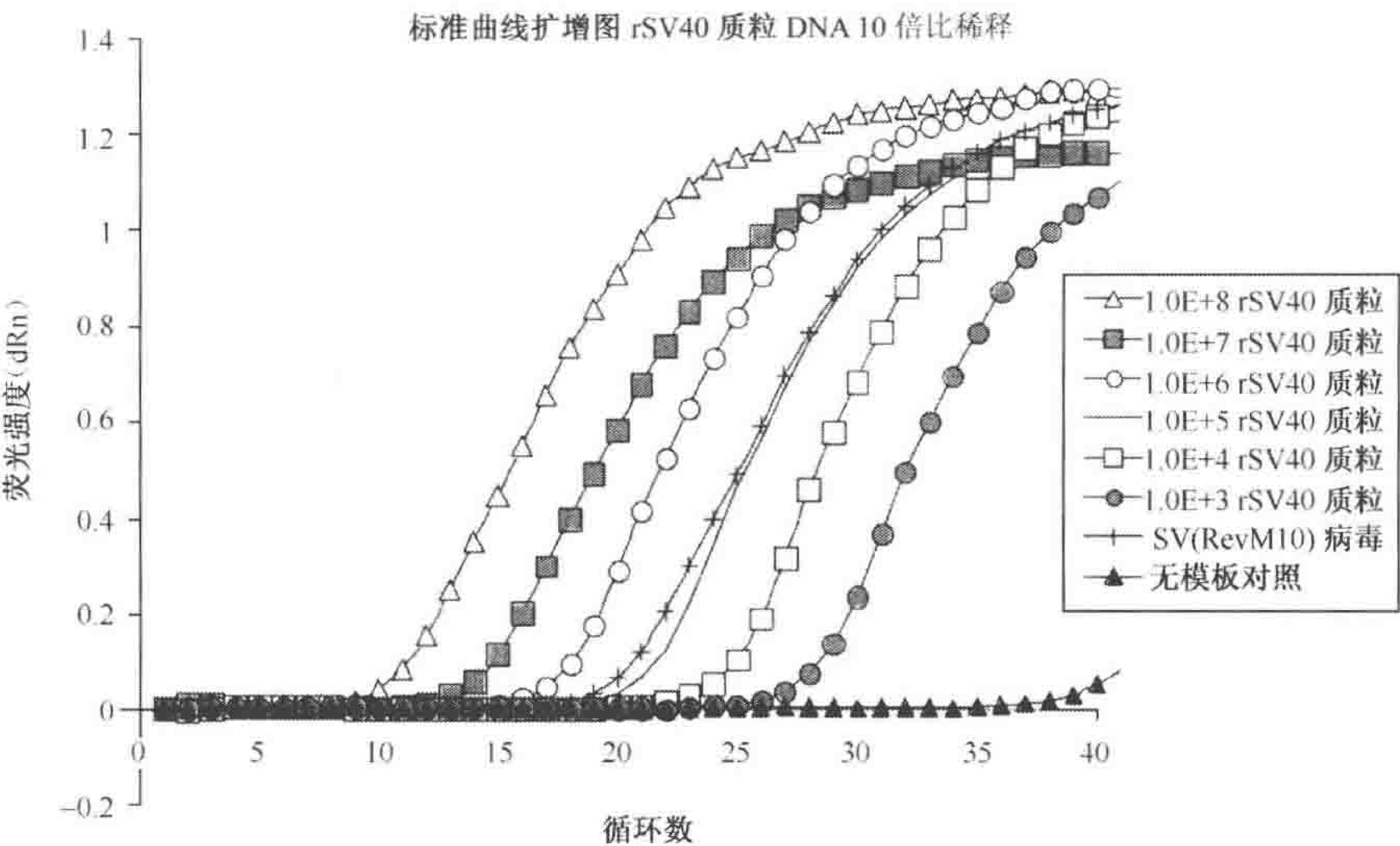



图 3. 标准梯度曲线扩增图。$1\times10^8$、$1\times10^7$、$1\times10^6$、$1\times10^5$、$1\times10^4$、$1\times10^3$ 个拷贝的 rSV40 质粒；未知拷贝数的 SV（RevM10）纯化病毒；无模板对照。

**表 3．图 3 中扩增图的循环阈值**

| qPCR 样品 | 循环阈值 |
|---|---|
| $1\times10^8$ rSV40 质粒 | 10.4 |
| $1\times10^7$ rSV40 质粒 | 13.95 |
| $1\times10^6$ rSV40 质粒 | 17.22 |
| $1\times10^5$ rSV40 质粒 | 20.79 |
| $1\times10^4$ rSV40 质粒 | 24.08 |
| $1\times10^3$ rSV40 质粒 | 27.79 |
| SV(RevM10)病毒 | 19.81 |
| 无模板对照 | no $C_t$ |

qPCR 也可以用来评估样品的纯度。在熔解（解离）曲线分析中，监测荧光强度，PCR 样品温度为 55℃～95℃逐渐上升。当温度升高时，各管中 qPCR 产物将会根据它们的大小和组成解离。qPCR 产物解离温度显示为一个峰，通常在 75～90℃。一个单峰说明只有一个 PCR 产物（图 5）。两个峰或者肩峰表明除了需要的产物之外还有一个反应产物存在，这将导致 $C_t$ 值不准确。

用于生产病毒的 COS-7 细胞整合了 SV40 基因组，所以 qPCR 引物应该扩增 rSV40

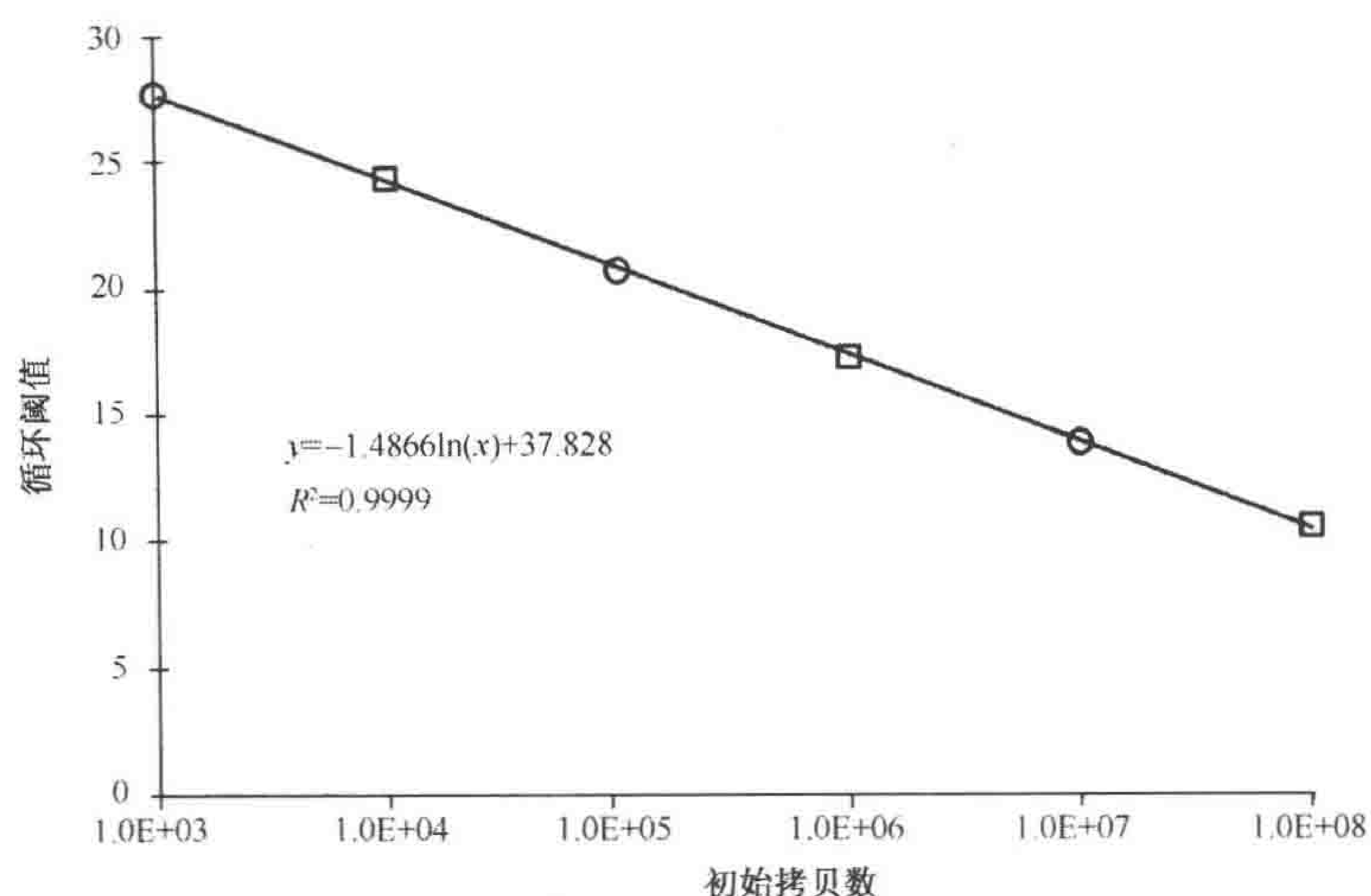



图 4. 循环阈值的标准曲线。用标准曲线稀释溶液（表 3 ）的循环阈值对初始拷贝数作图。SV（RevM10）反应的输入拷贝数可以通过用循环阈值替换 $y$ 并求 $x$ 解得到。要计算每毫升中的病毒基因组数，把初始拷贝数乘以 5（RNase/DNase 反应中 1∶5 稀释），然后乘以 500（使用了 2μl 经 RNase/DNase 处理的样品进行 qPCR）。

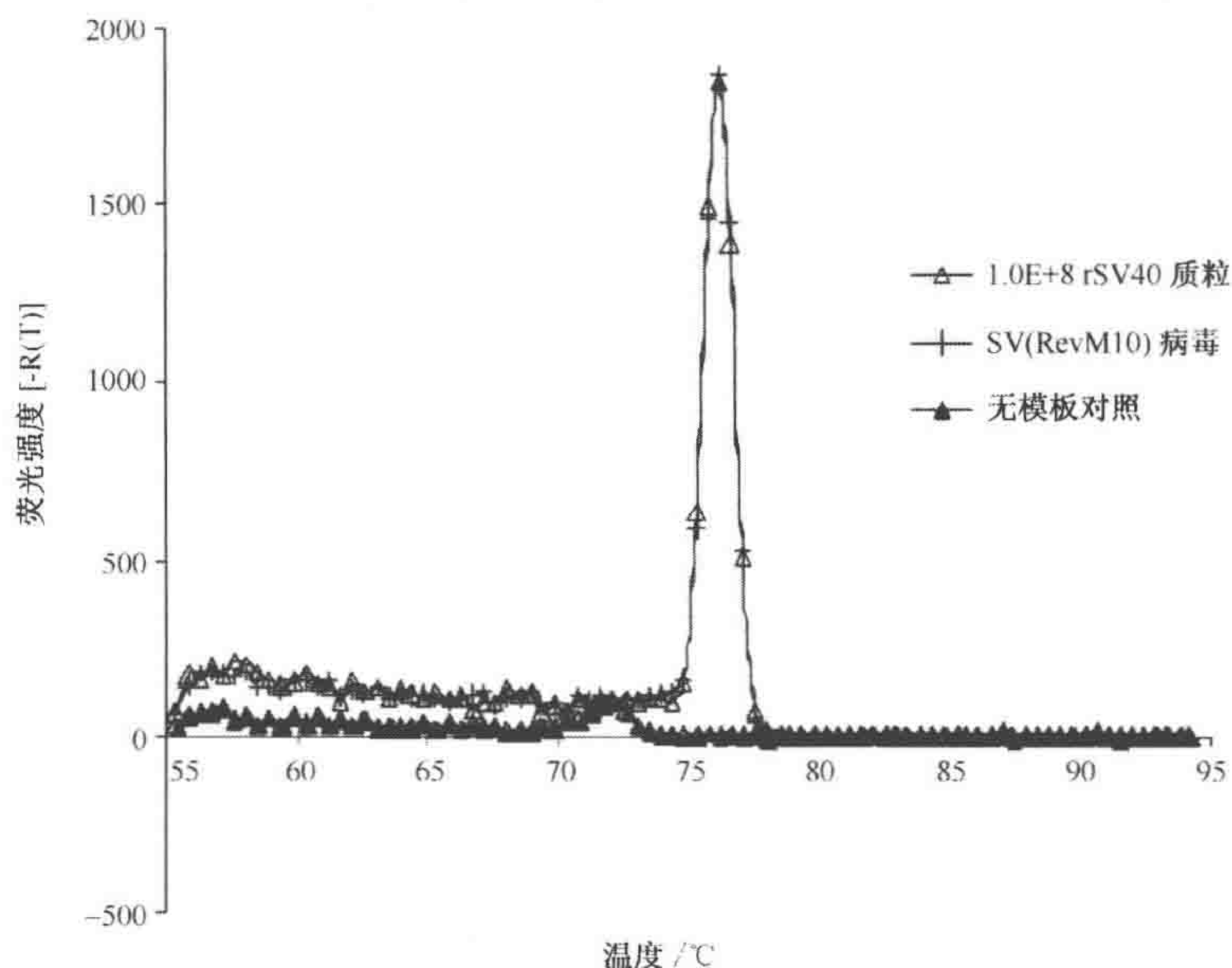



图 5. 解离（溶解）曲线。标准浓度 $1\times10^8$ 和 SV（RevM10）的解离曲线，它们在 76.3℃ 有相同的溶解峰。无模板对照反应在 72.1℃ 有一个小峰。

载体序列，而不是被整合的 SV40 DNA。与 SYBR Green 共用的引物至少要跨越 100～400bp，含有 15～30 个核苷酸，解链温度相差不能超过 2℃，G/C 含量应小于 50%，最好是在 35%～45%。引物的 3′端应避免有相同的碱基和 G/C 夹板（clamp）。有一些

在线的软件能帮助设计引物（primer 3，http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi；Amplify，http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/；BLAST，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Brilliant SYBR Green Master Mix（Stratagene）

试剂融化后在4℃保存。试剂盒中的SYBR Green和ROX成分对光线敏感，应尽量避光保存。

DNA引物（Integrated DNA Technologies）

正向引物：T7.1.fw；5′ AAA CAG ATC AGA TCC AGA CAT GAT 3′

反向引物：T7.277.rv；5′ATT CGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT 3′

这些引物和载体上的非SV40序列复性结合，得到277bp的扩增产物。T7.1.fw和T7.277.rv在100mmol/L盐浓度下的熔解温度分别为63.99℃和64.48℃，G/C含量为38.46%和41.67%。它们都是24个核苷酸。

磷酸盐缓冲液（PBS）

Plasmid Maxi Kit（QIAGEN）

RNase（500ng/μl；Roche Applied Sciences 1119915）< !>

RQ1 DNase（1U/μl；Promega）

在使用新开封的DNase前，要测定消除非衣壳化的DNA所需要的最小酶浓度。用0～3μl DNase设置几个质粒DNA反应。用下面提到的方法进行酶切、失活、qPCR，作标准曲线。使质粒模板减少到没有酶切的对照的2 log以上的DNase浓度可以用来处理病毒样品。

RQ1 DNase反应缓冲液

400mmol/L Tris（pH 8.0）< !>

100mmol/L $MgSO_4$< !>

10mmol/L $CaCl_2$< !>

RQ1 DNase终止液

20mmol/L EGTA（pH 8.0）

Tris-HCl（1mol/L，pH 7.5；无核酸酶；Fisher）

使用前用无核酸酶的水稀释成10mmol/L Tris-HCl，pH 7.5

水（PCR级别；无核酸；Fisher）

### 仪器

微量离心管（无核酸酶，Fisher）

微型离心机

Mx3000P qPCR Instrument（Stratagene）或其他qPCR仪器

qPCR 光学管和盖（8×strip，无核酸酶；Stratagene）
Sharp precision barrier tips（无核酸酶；Denville Scientific）
涡旋混合器

## 方法

### 测定标准曲线

1. 用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 提取作标准曲线用的质粒 DNA。在 $OD_{260}$ 定量。

   用作储液所需的 DNA 量取决于质粒的大小；1μg 1kb 的 DNA 等于 $9.1\times10^{11}$ 个分子的双链基因组 DNA。所以 $5\times10^{9}$ 个分子的 1kb DNA 等于 5.49ng。

2. 用质粒大小乘以 5.49 来计算 $5\times10^{9}$ 个分子的质粒所需要的 DNA 质量。
3. 用 10mmol/L Tris-HCl 稀释质粒以得到 $5.0\times10^{9}$ 个分子/μl 的储液。
4. 在 $OD_{260}$ 对 DNA 定量以检查储液浓度，必要时做相应调整。分装并于－20℃保存。
5. 解冻 $5\times10^{9}$ 个分子/μl 的储液，涡旋混合后瞬时离心。
6. 准备浓度 $5\times10^{8}$～$5\times10^{2}$ 的 10 倍系列稀释液。
   a. 每次稀释，将 10μl 前一次高浓度的溶液加入到 90μl 10mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）中。
   b. 每间隔 3～5s 涡旋混合均匀。
   c. 使用微型离心机瞬时离心每个浓度的稀释液。

   每次冷冻的储液都要用新的稀释液作标准曲线。稀释的 DNA 样品不能长期保存，在－20℃容易产生沉淀。

### DNase 和 RNase 酶切纯化的 rSV40

7. 再次使用 PBS 透析 100μl 已经纯化的 rSV40（从方案 1 的步骤 24 中得到），去除所有可能抑制 qPCR 的成分，如去污剂。立即使用或保存于－80℃。
8. 融解 RQ1 DNase 反应缓冲液。涡旋混合。

   确保盐分都溶解了。如果有白色沉淀，在 37～50℃孵育缓冲液，然后涡旋混合。

9. 按 1∶100 比例用 10mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）稀释 RNase。放置在冰上。

   每天都要更新稀释液。

10. 冰上（约 4℃）解冻 rSV40。
11. 用 DNase/RNase 酶切纯化的 rSV40。
    a. 将 1μl RQ1 DNase 反应缓冲液和 1μl 稀释的 RNase（5ng/μl）混合。加入适当体积的 10mmol/L Tris-HCl 使最终反应体系的体积达到 100μl。
    b. 加入 20～34μl 纯化的 rSV40 病毒。涡旋混合后，瞬时离心。放置在冰上。
    c. 置于冰上时，加入 1～3μl RQ1 DNase。

    加入的 DNase 的精确体积需要根据不同批的 DNase 来决定（参照前面的方法）。

12. 用 DNase/RNase 酶切质粒 DNA
    a. 混合 1μl RQ1 DNase 反应缓冲液和 1μl 稀释的 RNase（5ng/μl）。加入充分体积

的 10mmol/L Tris-HCl 使最终反应体系的体积达到 100μl。

b. 加入 10μl $5\times10^6$ 稀释后的质粒 DNA 和 20～34μl 的 PBS。涡旋混合后，瞬时离心。放置在冰上。

c. 始终放在冰上，加入 1～3μl RQ1 DNase。

加入的 DNase 的精确体积需要根据每一批的 DNase 来决定（参照前面的方法）。

13. 瞬时涡旋混合质粒和病毒样品，瞬时离心。

质粒和病毒的对照反应包含除 DNase 之外的所有成分。

14. 室温孵育样品 20min。
15. 将管子放回到冰上。每管中加入 1μl RQ1 DNase 终止液。瞬时涡旋混合后离心。
16. 在 75℃孵育反应液 10min 使 DNase 失活。瞬时离心，收集沉淀（condensation）。

使 DNase 失活对于 qPCR 过程中防止对引物和模板进行酶切是很关键的。

17. 立即用 qPCR 滴定（参照下面的方法）或－80℃储存以备将来使用。

## 用定量聚合酶链反应滴定（qPCR）

避免对 qPCR 反应产物的污染是很重要的。在整个过程中都要戴手套，使用带过滤层的移液器吸头。如果可能的话，使用一套专门的微量移液器移取试剂，并在与加入模板时的区域隔开的洁净区域操作。不要接触反应管的边缘和管盖内部。

18. 准备测定标准曲线的 10 倍系列稀释的质粒 DNA，浓度 $5\times10^7$～$5\times10^2$ 个分子/μl（步骤 1～6）。
19. 用无核酸酶的 PCR 级别水按 1∶500 稀释 ROX。
20. 每个反应样品中加入 12.5μl 2×主反应混合液（master mix），5pmol 前向引物，5pmol 反向引物，0.375μl 的稀释 ROX 对照染色剂，加入 PCR 级别水调整每个样品最终体积至 23μl。

为标准曲线、要滴定的未知病毒样品和无插入模板对照的每个点准备三份充分的反应混合液。考虑到微量移液器的误差，多准备至少一个样品的反应量。

21. 移取 23μl 上述反应混合液到 qPCR 光学管中。小心不要使样品中产生气泡。
22. 在将质粒和病毒样品加入到 qPCR 反应管之前，先涡旋混合并瞬时离心。
23. 加入 2μl 模板（质粒标准曲线和未知病毒）到各管。轻轻吹打混合均匀。避免产生气泡。加入 2μl 10mmol/L Tris-HCl 到对照管中。
24. 盖上管子，瞬时离心。把管子放到 qPCR 仪器里。
25. 根据样品模板和温度特性，设定 qPCR 仪器的程序（Strategene 2004）。PCR 设定如下：

95℃，10min。

95℃，30s，55℃，60s，72℃，30s，重复 40 个循环。

解离曲线：逐步增加温度，55～95℃，超过 30min。

## 分析 qPCR 数据

26. 将每个标准稀释液的 $C_t$ 值以初始模板的量作图。

这一步可以用 Mx3000P 软件自动进行或者手工使用作图软件（如 Excel）完成。

27. 通过与标准曲线比较来确定待滴定的未知样品的初始拷贝数。使用直线方程，而

$y$=未知样品的 $C_t$ 值（图 4）。

28. 使用下面的公式计算每毫升的病毒颗粒数：

    初始拷贝数×5×500 = 病毒拷贝数/ml

29. 根据解离曲线验证样品的纯度。一个单峰表明是一个 PCR 产物。

    PCR 产物的纯度和大小也可以根据琼脂糖凝胶电泳来确定。

## 致谢

本工作包括已经在我们实验室建立并使用 10 年的技术的最新修正。很多实验室成员及合作者参与了技术的改进，从而使我们的很多工作取得成功，他们是：Lokesh Agrawal、Omar Bagasra、Pierre Cordelier、Ling-Xun Duan、Harris Goldstein、Geetha Jayan、Maria Lamothe、Bianling Liu、Jean-Pierre Louboutin、Hayley Mckce、Iwata Ozaki，Roger Pomerantz、Marlene Strayer、Danlan Wei 和 Mark Zern。我们非常感谢 Baylor College of Medicine 的 Janet S. Butel 博士无私提供给我们很多原始试剂以及建议。感谢 NIH 中支持我们计划的工作人员，他们是：Sandra Bridges、Scott Cairns、Kathy Kopniski、Diane Rausch、Nava Sarver 和 Frosso Voulgaropoulou。本工作得到了 NIH 基金 AI41399、AI48244、MH69122、MH70287 和 RR13156 的资助。

### 参 考 文 献

Asano M., Iwakura Y., and Kawade Y. 1985. SV40 vector with early gene replacement efficient in transducing exogenous DNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **13:** 8573–8586.

Breau W.C., Atwood W.J., and Norkin L.C. 1992. Class I major histocompatibility protein share an essential component of the simian virus 40 receptor. *J. Virol.* **66:** 2037–2045.

Cole C.N. and Conzen S.D. 2001. *Polyomavirinae*: The viruses and their replication. In *Fields' virology* (ed. D.M. Knipe and P.M. Howley), pp. 2141–2174. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.

Fried M. and Prives C. 1986. The biology of simian virus 40 and polyomavirus. *Cancer Cells* **4:** 1–16.

Gething M.J. and Sambrook J. 1981. Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene. *Nature* **293:** 620–625.

Pelkmans L., Kartenbeck J., and Helenius A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3: 473–483.

Pelkmans L., Puntener D., and Helenius A. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296:** 535–539.

Rosenberg B.H., Deutsch J.F., and Ungers G.E. 1981. Growth and purification of SV40 virus for biochemical studies. *J. Virol. Methods* **3:** 167–176.

Rund D., Dagan M., Dalyot-Herman N., Kimchi-Sarfaty C., Schoenlein P.V., Gottesman M.M., and Oppenheim A. 1998. Efficient transduction of human hematopoietic cells with the human multidrug resistance gene 1 via SV40 pseudovirions. *Hum. Gene Ther.* **9:** 649–657.

Sauter B.V., Parashar B., Chowdhury N.R., Kadakol A., Ilan Y., Singh H., Milano J., Strayer D.S., and Chowdhury J.R. 2000. Gene transfer to the liver using a replication-deficient recombinant SV40 vector results in long-term amelioration of jaundice in Gunn rats. *Gastroenterology* **119:** 1348–1357.

Stang E., Kartenbeck J., and Parton R.G. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* **8:** 47–57.

Stratagene 2004. *Introduction to quantitative PCR: Methods and application guide.* Stratagene, LaJolla, California.

Strayer D.S. 1996. SV40 as an effective gene transfer vector *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271:** 24741–24746.

——. 1999. Effective gene transfer using viral vectors based on SV40. *Methods Mol. Biol.* **133:** 61–74.

Strayer D.S. and Milano J. 1996. SV40 mediates stable gene transfer *in vivo*. *Gene Ther.* **3:** 581–587.

Strayer D.S., Lamothe M., Wei D., Milano J., and Kondo R. 2001. Generation of recombinant SV40 vectors for gene transfer. *Methods Mol. Biol.* **165:** 103–117.

Strayer D.S., Branco F., Zern M.A., Yam P., Calarota S.A., Nichols C.N., Zaia J.A., Rossi J., Li H., Parashar B., Ghosh S., and Chowdhury J.R. 2002. Durability of transgene expression and vector integration: Recombinant SV40-derived gene therapy vectors. *Mol. Ther.* **6:** 227–237.

Tsai B., Gilbert J.M., Stehle T., Lencer W., Benjamin T.L., and Rapoport T.A. 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* **22:** 4346–4355.

Vera M., Prieto J., Strayer D.S., and Fortes P. 2004. Factors influencing the production of recombinant SV40 vectors. *Mol. Ther.* **10:** 780–791.

## 网络资源

http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/ (Amplify software).

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi (Primer3 software).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Basic Local Alignment Search Tool [BLAST]).

# 第二十五章 SV40的体外包装：一种假病毒体基因递送系统

Chava Kimchi-Sarfaty[*] 和 Michael M. Gottesman[†]
[*] Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration; [†] Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892

叶文彬和付超 译



## 摘要

感染了杆状病毒的草地贪夜蛾（Sf9）昆虫细胞的细胞核提取物编码猿猴病毒40（SV40）的主要外壳蛋白（VP1）。在有 $MgCl_2$、$CaCl_2$ 和 ATP 存在时，这些核提取物能包装超螺旋结构的质粒 DNA 或 RNA 干扰（RNAi）序列，从而在体外形成 SV40 假病毒体。这种包装方法和其他病毒或非病毒传递系统相比有许多优点。特别是它拥有广泛的宿主范围和高转化率。这个系统唯一的缺点是体外观察到每个转化细胞的表达量过低，可能是由于产生的 DNA 被限制在细胞质中，不能进入到细胞核内。

## 引言

空 SV40 衣壳蛋白可以通过消除二硫键而解组装，并能在有 Ca 离子存在时，围绕 DNA 重新组装产生一个假病毒体（Colomar et al. 1993）。事实上，在有 Ca 离子和其他盐存在时，细菌中的多瘤病毒 VP1（缺乏 VP2 或 VP3 的 SV40 衣壳蛋白）能组装成病毒衣壳（Salunke et al. 1986）。SV40 衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3 和 agno 能够包装带有 SV40 复制起点的 DNA（Sandalon and Oppenheim 1997; Sandalon et al. 1997）。由多瘤病毒衣壳蛋白包被的宿主 DNA 片段可以感染幼鼠的肾细胞（Michel et al. 1967; Winocour 1968）。类似的，在低离子环境下，超螺旋的多瘤病毒 DNA 可以由多瘤病毒样的颗粒包装，能感染鼠和人的胚胎细胞（Qasba and Aposhian 1971）。

SV40体外包装传递系统是很独特的，因为它不需要任何SV40序列，也不需要包装细胞系（Kimchi-Sarfaty et al. 2003）。其他SV40传递方法需要用转基因替换一些野生型的病毒基因（Rund et al. 1998）。这就允许携带比野生型SV40的一般容量5.2kb更大的报道基因。这些系统还需要一个包装细胞（通常是COS-1或COS-7细胞）来提供T抗原并包装病毒（Rund et al. 1998）。与此相对应，体外SV40包装传递系统能携带容量上限为17.7kb的DNA，并且不需要任何SV40序列和包装细胞系。体外包装传递系统相比于其他病毒和非病毒传递系统的优点总结列在表1中。这个系统唯一的缺点是体外观察到每个转化细胞的表达过低，可能是由于DNA被限制在细胞的细胞质中，不能进入到细胞核内的结果（Kimchi-Sarfaty et al. 2004）。体外假病毒颗粒的形状和SV40野生型病毒很相似。但是，颗粒的大小可能会受被包装的DNA大小影响。例如，pHaMDR1质粒（15.2kb）形成的颗粒直径为55nm，平均比野生型SV40大10nm（图1）（Kimchi-Sarfaty et al. 2003）。

**表1. SV40体外包装系统进行基因传递的优点**

| | |
|---|---|
| 转化细胞 | 具有很强的感染非分裂细胞和分裂细胞的能力 |
| | 有很多可供体外实验使用的细胞系(HeLa、Hek293、K562、淋巴母细胞样细胞、NIH-3T3) |
| | 在体内有很高的转化效率(在C57BL、裸鼠和大鼠中测试过) |
| | 对贴壁细胞和悬浮细胞有很高的转化效率 |
| 报道基因 | 报道基因可以克隆到任何质粒,从而使用不同的启动子 |
| | 不需要SV40序列 |
| | SV40体外包装系统有很高的容量(报道基因质粒DNA可达17.7kb) |
| | 不需要包装细胞系 |
| | siRNA也能包装并传递 |
| 表达 | 非常高的转化效率(接近100%的细胞表达报道基因) |
| | 体外系统是短期表达,不整合到宿主DNA中 |
| | 体外表达系统只有在进行选择筛选时可以长期表达 |
| | 非常低的(如果有的话)抗原性 |
| | 对细胞存活没有影响 |
| | 体内和体外都几乎没有细胞毒性 |

体外颗粒进入人淋巴母细胞样细胞的途径是已知的。虽然主要组织相容性复合体（MHC）I型受体在野生型SV40和体外颗粒进入过程中都有重要作用，但是对于它们的进入不是必需的（Norkin 1999）。一些包装的质粒在转化后30min出现在高尔基体，并最终在内质网堆积。去除包装的质粒DNA接着从内质网转移到细胞核（Kimchi-Sarfaty et al. 2004）。体外包装的DNA是暂时表达的（最长3周），但是通过选择可以维持表达（Kimchi-Sarfaty et al. 2003; Kimchi-Sarfaty and Gottesman 2004）。也可利用这条途径将小干扰RNA（siRNA）传递到细胞质。如果使用和DNA相同的包装方法，与Lipofectamine-Plus相比，经SV40体外包装的siRNA能导致高传递效率，也能延长表达的时间（Kimchi-Sarfaty et al. 2005）。

可以通过传递多药转运子基因*MDR*1（ABCB1）或*MXR*（ABCG2）达到化学保护的目的，这在人和鼠细胞中能有很高的效率。报道基因，如绿色荧光蛋白（GFP）也能传递到不同的细胞系中，包括人淋巴母细胞样细胞和红细胞白血病细胞（K562）。不

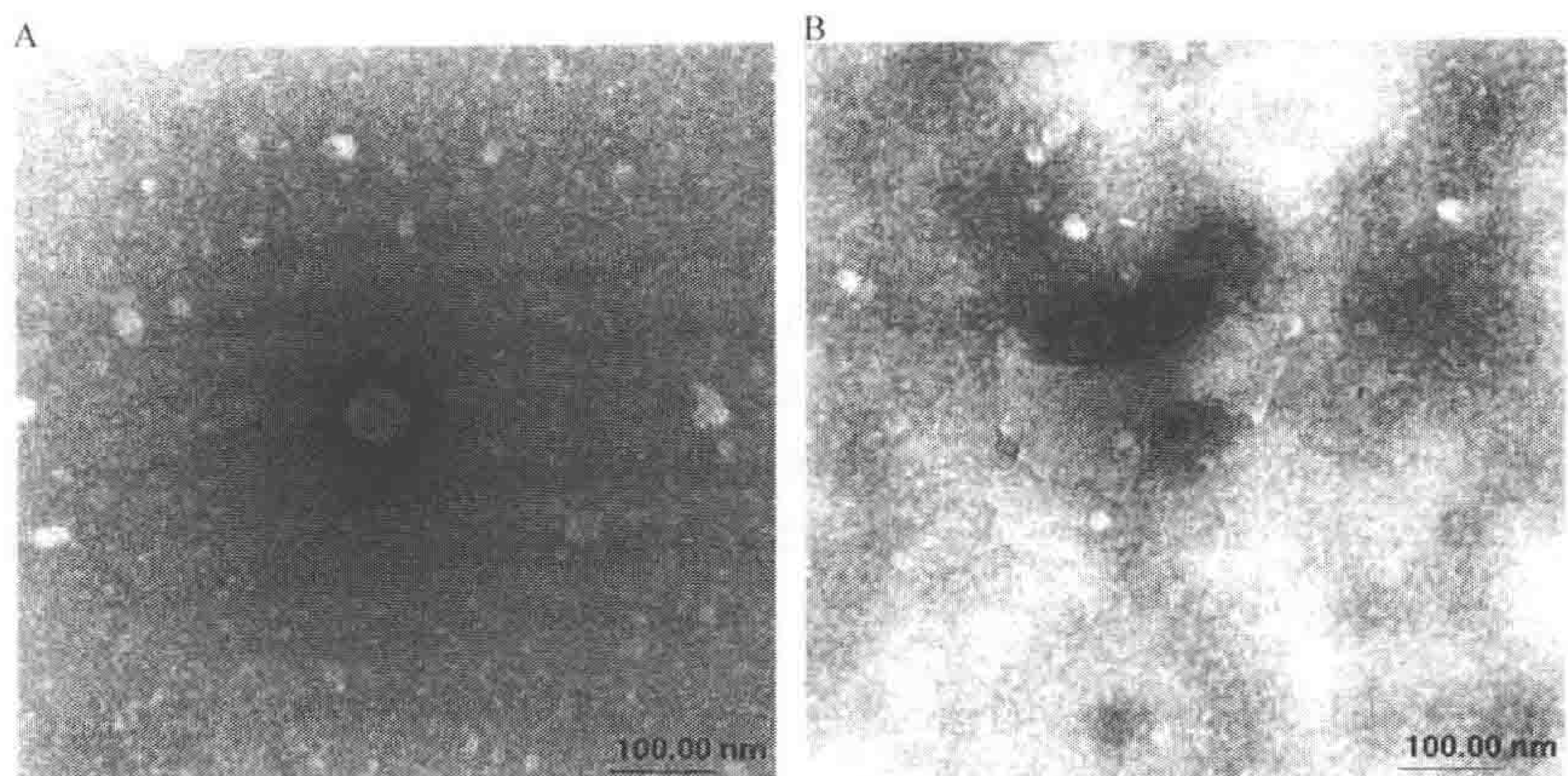



图 1. 电子显微镜下的假病毒体和野生型 SV40。样品吸附在碳镀去静电铜网（glow-discharged carbon-coated Formvarfilm grid）上，负染电镜检查。图像由 Hitachi H7000 电子显微镜的 Gatan 数字图像系统在 75kV，25 000 倍放大率下捕捉。A. 使用经 VP1 转化的 Sf9 细胞核提取物，在有 $MgCl_2$、ATP 和 $CaCl_2$ 存在时体外包装 pHaMDR1 质粒 DNA（15.2kb；多药耐药基因处于 Havey 反转录病毒长末端重复启动子下游）。B. 野生型 SV40 病毒 SV40 按前面描述的方法从 COS-7 细胞中纯化得到（Rund et al. 1998），存放于－20℃，解冻后前面所说的方法制备进行电镜观察（经允许引自 Kimchi-Sarfaty et al. 2003）。

同的启动子（如有或没有内含子的 SV40 或巨细胞病毒［CMV］）有很高的效率，而表达水平有些微差别（图 2）。尽管如此，由质粒 DNA 携带的人类免疫力缺陷性病毒（HIV）或 SV40 的核定位信号并没有改变由体外颗粒传递的 GFP 报道基因的效率或表达量。在体内实验中，GFP 基因在经腹腔注射后的小鼠的几个组织中有表达（Kimchi-Sarfaty and Gottesman 2004）。类似的，当一种毒素基因（绿脓杆菌外毒素；Kimchi-Sarfaty et al. 2006）和抗血管生成基因（色素上皮细胞衍生因子）经 SV40 的体外包装传递到裸鼠的肺腺癌时，肿瘤体积显著减小。

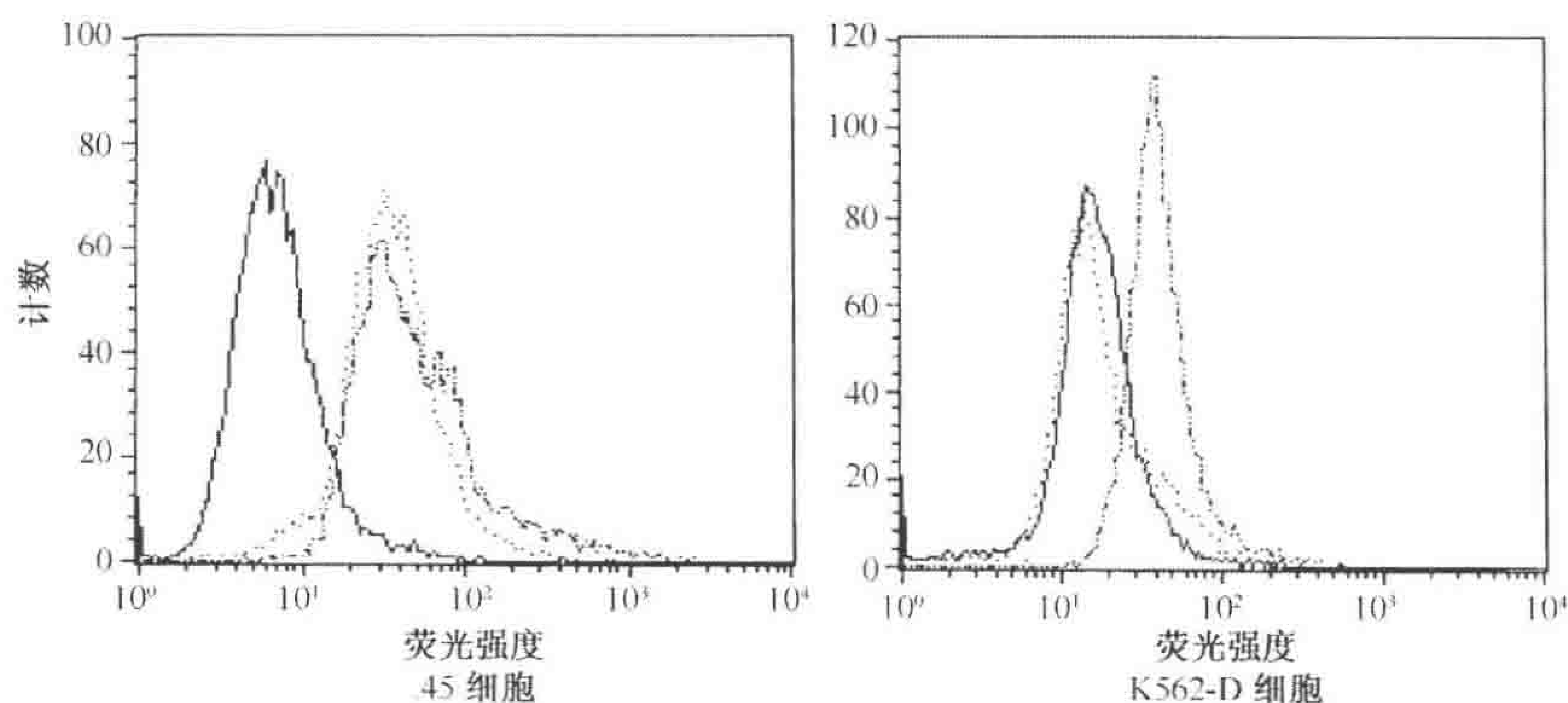



图 2. K562 人白血病细胞中和 45 人淋巴母细胞样细胞和 GFP 报道基因共孵育并在体外包装。使用了分别包含 CMV 或者 SV40 启动子的两种不同的 GFP 重组质粒。（虚线）感染体外制备的 CMV-EGFP-C1 载体的细胞；（点线）感染体外制备的 SV40-EGFP-C1 载体的细胞；（实线）对照组（空衣壳）（经允许引自 Kimchi-Sarfaty et al. 2002）。

## 方案

# SV40 体外传递系统

这里所说的方案使用已感染能编码 SV40 主外壳蛋白（VP1）的杆状病毒的 *S. frugiperda*（*Sf*9）昆虫细胞。来自这些细胞的核提取物（Schreiber et al. 1989；Sandalon and Oppenheim 2001）在 $MgCl_2$、$CaCl_2$ 和 ATP 存在时被用于体外包装超螺旋质粒 DNA 或者 siRNA，从而形成 SV40 假病毒体（图 3）（Sandalon et al. 1997；Kimchi-Sarfaty and Gottesman 2004；Kimchi-Sarfaty et al. 2005）。

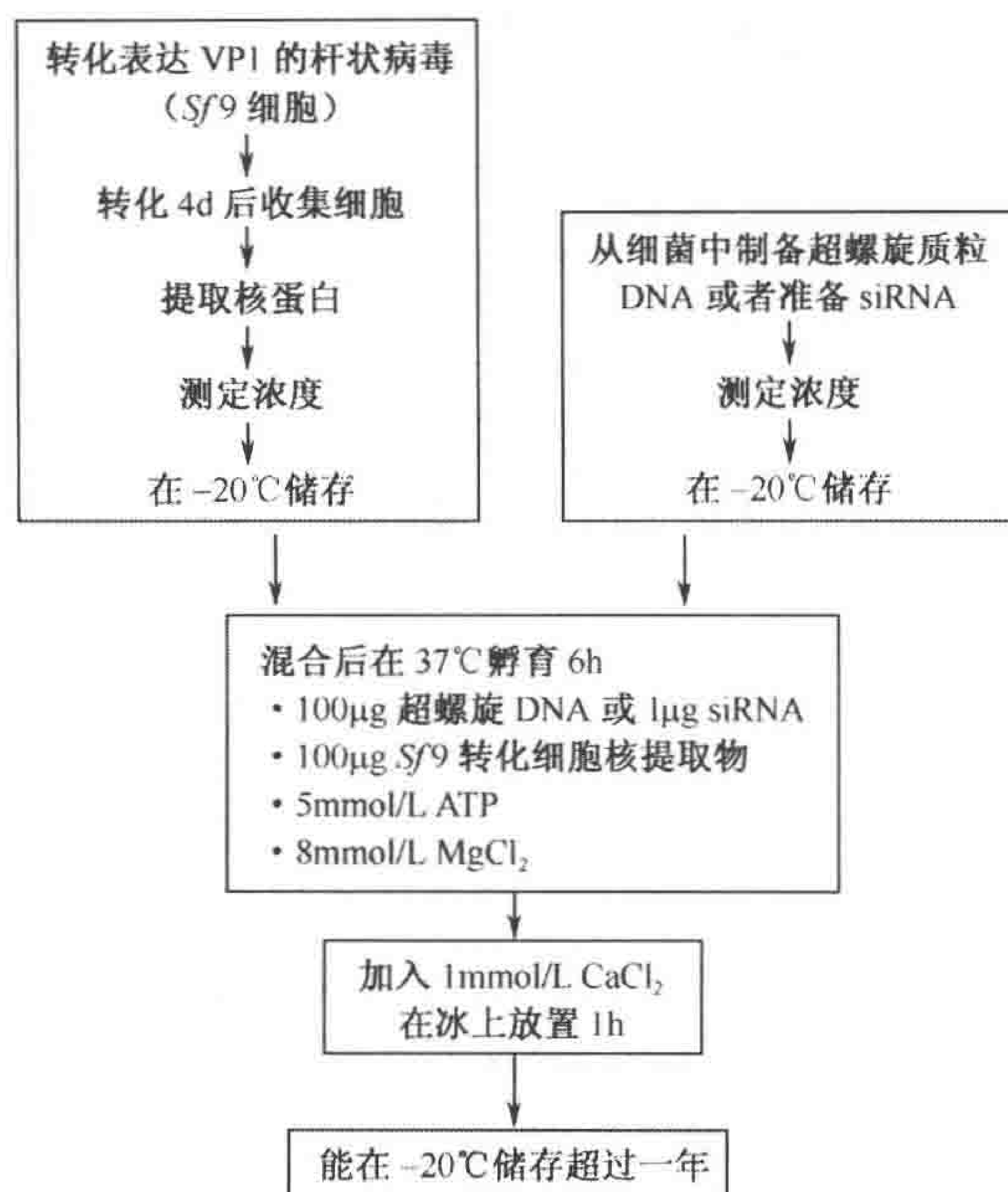



图 3. 制备假病毒颗粒流程

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

ATP（100mmol/L；Roche）

缓冲液 I

- 10mmol/L HEPES（pH7.9）
- 10mmol/L KCl <!>
- 0.1mmol/L EDTA
- 0.1mmol/L EGTA

用0.22μm滤膜过滤灭菌。缓冲液I能在4℃保存30d。

使用前加入：

0.5mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF）<!>

1mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）<!>

在1ml PBS中溶解1片蛋白酶抑制剂（Roche 1873580），用缓冲液I 1∶50稀释。

缓冲液 II

20mmol/L HEPES（pH 7.9）

0.4mmol/L NaCl

0.1mmol/L EDTA

1mmol/L EGTA

用0.22μm滤膜过滤灭菌。缓冲液II能在4℃保存30d。

使用前加入：

1mmol/L PMSF

1mmol/L DTT

在1ml PBS中溶解1片蛋白酶抑制剂（Roche 1873580），用缓冲液I 1∶50稀释。

$CaCl_2$（10mmol/L）<!>

细胞

用于研究的细胞系

在培养皿或悬浮维持要转化的细胞系。

草地夜蛾（Sf9）细胞

培养基

细胞生长培养基（含有乳清蛋白和yeastolate的Grace昆虫培养液）

完全生成培养基

使用所研究细胞系合适的培养基。

$MgCl_2$（200mmol/L）<!>

Nonidet P-40（NP-40；10% *V/V* in PBS）<!>

磷酸盐缓冲液（PBS）

质粒DNA（可达17.7kb）

要获得最高体外包装效率，使用CsCl<!>——氯化铯密度梯度平衡离心纯化质粒DNA。

小干扰RNA（siRNA）

VP1杆状病毒

通过引入一个*Stu*I-*Bcl*I DNA片段（SV40上1463～2770）到由*Autographa californica* nuclear pholyhedrosis病毒（AcMNPV）衍生（Luckow and Summers 1988）的pVL1393质粒（PharMingen，San Diego，California）中，进行VP1的克隆（PharMingen，San Diego，California）。然后经限制性内切核酸酶*Sma*I和*Bgl*II（Sandalon and Oppenheim 1997，2001）消化。分装病毒储液，保存在−80℃中。

## 仪器

培养箱（恒湿，37℃，5% $CO_2$）

离心管（40ml，无菌，Sorvall）
微型离心管（1.5ml）
摇床
搅拌培养瓶（250ml）
组织培养皿（60mm）
有微型离心管平台的涡旋混合器
恒温水浴锅（37℃）

## 方法

### 转化 *Sf*9 细胞

1. 在 250ml 培养瓶中，以感染复数为 10 的 VP1 杆状病毒感染新鲜培养的 $5\times10^{8}$ *Sf*9 细胞。

   不建议放大到 500ml。

### 核蛋白提取

感染后 4～5d 收集 *Sf*9 细胞。收获细胞的时间由 VP1 的表达水平及核提取物的包装功能决定。

2. 把转化后的细胞从 250ml 培养瓶转移到预冷的 40ml 试管中。
3. 准备缓冲液 I 和 II。放置在冰上。预冷微型离心管。
4. 用冷的 PBS 清洗细胞三次，每次在 4℃，6000r/min 离心 5min。
5. 去上清。涡旋使沉淀完全重悬

   这一步不要冷冻。

6. 加入 1ml 缓冲液 I。轻轻吹打使沉淀重悬直到完全分散。
7. 慢慢加入 28ml 缓冲液 I。在冰上孵育 15min。
8. 加入 2.3ml 10% NP-40。涡旋混合 10s。
9. 在冷冻离心机（约 4℃）中 13 000r/min 离心 3min。
10. 用连接真空吸气器的吸头去除上清。

    细胞核内物质在沉淀中。

11. 涡旋振荡沉淀。加入 5ml 缓冲液 II。充分混合后转移到微量离心管中。

    每管的总体积不要超过 1ml。

12. 把管子放在连接到振荡器的平台上。4℃涡旋混合 15min。
13. 4℃，13 000r/min 离心微量离心管 5min。
14. 将核提取物上清分装到预冷的管子里。
15. 测定核提取物的蛋白质浓度。

    注意到核提取物含有 NP-40 。并不是所有测定蛋白质浓度的方法都和 NP-40 兼容。只有当浓度超过 3mg/ml 才能用于体外包装。

16. 在 －20 ～－80℃储存核提取物。

## 体外包装

17. 对于每个反应的体外包装混合液，在微量离心管中加入 24μl 200mmol/L $MgCl_2$、30μl 100mmol/L ATP 和 100μg 从 VP1-转化细胞中得到的核提取物。
18. 加入 100μg 质粒 DNA 或 1μg siRNA。

    体外包装反应的对照应是无核提取物的反应、从未转化的 Sf9 细胞得到的核提取物的反应或报道基因 DNA。
19. 加入双蒸水到总体积 600μl。充分混合。
20. 37℃水浴孵育 6h。
21. 加入 66μl 10mmol/L $CaCl_2$ 到每个反应管中。轻轻涡旋混合。
22. 在冰上孵育 1h。
23. 在－20℃保存体外包装反应管直到使用。

## 使用 SV40 体外包装转化细胞

对原来的实验步骤所做的一些改变可以同时提高在几种细胞系的表达水平和转化效率（表 2）。

**表 2. 增加到原来实验方法里能提高表达量和转化率的步骤**

| | |
|---|---|
| 体外准备 | 在步骤 19 之前加入 0.3mmol/L 谷胱甘肽二硫化物和 3mmol/L 还原型谷胱甘肽 |
| 包装反应 | 在转化之前，用 0.1 单位的 DNase I 消化 0.01 个体外包装反应液 30min 后马上放到冰上 |
| 细胞转化 | 转化前 5d，在细胞里加入 0.5ng/ml 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate) |
| | 长期表达可以通过选择，转化后 24～48h 就可以开始使用药剂，如对于新霉素使用 600μg/ml G418，*MDR*1 使用 60μg/ml 的秋水仙素 |
| | 使用相同的方法在第一次转化 24h 后再次转化细胞 |
| | 使用两个原来反应的体外载体(步骤 14)用微量浓缩过滤系统浓缩成一个反应的体积(Centricon 离心过滤系统体积至少 2ml，YM-100 m.w.膜 Millipore) |
| | 转化前加入 10ng/ml 的组蛋白去乙酰化抑制剂 TSA 到细胞中 |

24. 转化前 16～24h，用胰酶消化贴壁生长的所需细胞系。
25. 转移细胞到 60mm 组织培养皿，密度为每盘 $1\times10^5$ 个细胞。

    如果细胞是悬浮生长，每个 60mm 培养皿中加入 $1\times10^5$ 个细胞，总体积 340μl。
26. 加入 5ml 完全培养基。在 37℃，5%$CO_2$ 恒湿培养箱中孵育。
27. 解冻体外包装反应管（步骤 23）。每个盘中加入一管体外包装反应液。

    用经裸露 DNA 转化的细胞作为对照。
28. 把盘子放在位于培养箱内的摇床上。摇 2.5h。
29. 加入 4ml 新鲜的完全生成培养基到每个盘中。然后放回到培养箱里。
30. 24h 后或转化后更长时间计算基因表达量和功能。

## 致谢

我们感谢 Kunio Nagashima（NCI-Frederick，SAIC Frederick）拍摄 SV40 的电子

显微图像。我们还要向帮助编辑的 George Leiman 先生以及与我们在 SV40 体外包装假病毒颗粒方面共同合作与研讨的 Ariella Oppenheim 博士（Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel）表示感谢。

## 参考文献


Colomar M.C., Degoumois-Sahli C., and Beard P. 1993. Opening and refolding of simian virus 40 and in vitro packaging of foreign DNA. *J. Virol.* **67:** 2779–2786.

Kimchi-Sarfaty C. and Gottesman M.M. 2004. SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer and their potential application in cancer therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5:** 451–458.

Kimchi-Sarfaty C., Arora M., Sandalon Z., Oppenheim A., and Gottesman M.M. 2003. High cloning capacity of in vitro packaged SV40 vectors with no SV40 virus sequences. *Hum. Gene Ther.* **14:** 167–177.

Kimchi-Sarfaty C., Ben-Nun-Shaul O., Rund D., Oppenheim A., and Gottesman M.M. 2002. In vitro-packaged SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **13:** 299–310.

Kimchi-Sarfaty C., Brittain S., Garfield S., Caplen N.J., Tang Q., and Gottesman M.M. 2005. Efficient delivery of RNA interference effectors via in vitro-packaged SV40 pseudovirions. *Hum. Gene Ther.* **16:** 1110–1115.

Kimchi-Sarfaty C., Garfield S., Alexander N., Ali S., Cruz C., Chinnasamy D., and Gottesman M.M. 2004. The pathway of uptake of SV40 pseudovirions packaged in vitro: From MHC class I receptors to the nucleus. *Gene Ther. Mol. Biol.* **8:** 439–450.

Kimchi-Sarfaty C., Vieira W.D., Dodds D., Sherman A., Kreitman R.J., Shinar S., and Gottesman M.M. 2006. SV40 Pseudovirion gene delivery of a toxin to treat human adenocarcinomas in mice. *Cancer Gene Ther.* **3:** 648–657.

Michel M.R., Hirt B., and Weil R. 1967. Mouse cellular DNA enclosed in polyoma viral capsids (pseudovirions). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **58:** 1381–1388.

Norkin L.C. 1999. Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol. Rev.* **168:** 13–22.

Qasba P.K. and Aposhian H.V. 1971. DNA and gene therapy: Transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68:** 2345–2349.

Rund D., Dagan M., Dalyot-Herman N., Kimchi-Sarfaty C., Schoenlein P.V., Gottesman M.M., and Oppenheim A. 1998. Efficient transduction of human hematopoietic cells with the human multidrug resistance gene 1 via SV40 pseudovirions. *Hum. Gene Ther.* **9:** 649–657.

Salunke D.M., Caspar D.L., and Garcea R.L. 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein vp1. *Cell* **46:** 895–904.

Sandalon Z. and Oppenheim A. 1997. Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* **237:** 414–421.

———. 2001. Production of SV40 proteins in insect cells and in vitro packaging of virions and pseudovirions. *Methods Mol. Biol.* **165:** 119–128.

Sandalon Z., Dalyot-Herman N., Oppenheim A.B., and Oppenheim A. 1997. In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: Vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8:** 843–849.

Schreiber E., Matthias P., Muller M.M., and Schaffner W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts," prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17:** 6419.

Winocour E. 1968. Further studies on the incorporation of cell DNA into polyoma-related particles. *Virology* **34:** 571–582.

# 第二十六章　基于杆状病毒的展示和基因传递系统

Anna R. Mäkelä,[*] Wolfgang Ernst,[†] Reingard Crabherr[†] 和 Christian Oker-Blom[*]

[*] NanoScience Center, Department of Biological and Environmental Science, FIN-40014 University of Jyväskylä, Finland;[†] University of Agriculture, Institute of Applied Microbiology, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria

何杰和吕青　译



## 摘要

杆状病毒表达载体系统已经广泛用于生产多种原核和真核来源的蛋白质。除了简便的克隆操作以及大量的病毒繁殖之外，该系统还可以提供基于昆虫细胞环境的真核转录后修饰的机制。新近建立的真核系统的分子生物学工具——杆状病毒展示载体系统（baculovirus display vector system，BDVS），可以将基因型与表现型整合起来，从而使外源肽段甚至是复杂蛋白质在杆状病毒的包膜或衣壳上呈现出来。这种策略非常重要，因为这可以提高病毒结合和进入哺乳动物细胞的能力，以及用于生产针对展示抗原的抗体。此外，这项技术也可调节细胞内的行为，即重组“纳米颗粒”的穿梭，这是一种在靶基因和靶蛋白递送领域中高度相关的特点。本章将会讨论昆虫来源的杆状病毒展示载

体的设计及其潜在的用途。建立展示库的一般步骤和这些基因递送载体的特性也将会在本章中进行阐述。

## 引言

### 杆状病毒展示的策略

原核噬菌体展示系统允许大量编码不同功能的基因从复杂的文库中被分离出来。然而原核展示系统固有的局限性，尤其是当被展示蛋白质需要折叠和翻译后修饰时，促使了替代它的真核展示系统的发展。过去的十多年间，用于在病毒表面呈现外源肽段或复杂蛋白质的基于杆状病毒的展示策略已经建立起来，并且已在体内和体外的应用都做了评价（Grabherr and Ernst 2001；Grabherr et al. 2001；Huser et al. 2001；Huser and Hofmann 2003；Oker-Blom et al. 2003）。可通过修饰主要被膜糖蛋白（gp64），展示融合到异源膜锚定子的外源多肽或假病毒来改变苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（*Autographa californica* multiple nucleopolyhedro-virus，*Ac*MNPV）的趋向性和转导效率（Oker-Blorn et al. 2003）。此外，*Ac*MNPV 的主要衣壳蛋白（vp39）提供了一个用于在病毒衣壳上展示外源蛋白质的适合融合伴侣（Kukkonen et al. 2003；Oker-Blorn et al. 2003）。以上这些特性，加上可以整合到受哺乳动物启动子转录调控的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）、β-半乳糖苷酶和萤光素酶报道基因的能力，使之能够体外监测哺乳动物细胞的转导效率（Shoji et al. 1997；Yap et al. 1997；Condreay et al. 1999；Kost and Condreay 2002；Kost et al. 2005）和体内组织（Airenne et al. 2000；Lehto lainen et al. 2002；Huser and Hofmann 2003；Tani et al. 2003；Liet al. 2004；Hoare et al. 2005）。诸如同源重组和位点特异的转座等这些众多的为了产生重组杆状病毒载体的系统已经被详细阐述（Peakrnan et al. 1992；Airenne et al. 2003；Luckow et al. 1993）。下面的内容概述了现今杆状病毒展示的策略和构建（engineer）这些潜在的基因传递载体的方法学。

### 通过与 gp64 融合的表面展示

主要的杆状病毒被膜糖蛋白 gp64 在被感染的昆虫细胞表面和出芽病毒颗粒以同源三聚体的形式存在，形成典型的病毒包膜结构（Oomens et al. 1995；Markovic et al. 1998）。类似于已建立的原核噬菌体展示系统，外源蛋白质与 gp64 融合后能够展示在 *Ac*MNPV 的表面（图 1A）。这个原理的第一项证据是在将几个整合了谷胱甘肽硫转移酶（GST）的 gp64 融合变异体在昆虫细胞和出芽的病毒表面成功表达，以及将人免疫缺陷病毒（HIV-1）主要表面糖蛋白（gp120）整合到 gp64 的氨基端并说明功能性配体结合活性时获得的（Boublik et al. 1995）。另一项研究中，同一个病毒的被膜蛋白（gp41）的胞外结构域被融合到天然的和被删节的 gp64 上（Grabherr et al. 1997）。类似地，风疹病毒的棘蛋白 E1 和 E2，以及 GFP，也能够在 *Ac*MNPV 表面得以展示（Mo ttershead et al. 1997）。

这些初步的结果引起了更多地着眼于病毒对哺乳动物细胞更特异的靶向性的研究。

gp64 介导的针对癌胚抗原和半抗原 2-苯基 唑酮（2-phenyloxazolone）的单链抗体片段（scFv）展示、蛋白 A（Mottershead et al. 2000；Ojala et al. 2001）的 IgG-结合 Z 结构域，以及与亲和素（Raty et al. 2004）连接的“哺乳动物化”的报道基因，这些结果已经显示了杆状病毒在靶基因投递上的潜力。值得注意的是，补体调节蛋白和人加速衰变因子可以用于保护杆状病毒展示载体免受补体的灭活（Huser et al. 2001）。通用 T 表位插入已经不用再改变或者干扰病毒的感染能力，而是直接修改天然的 gp64 的编码序列即可完成（图 1B）（Ernst et al. 1998，2000；Spenger et al. 2000）。gp64 融合方案也已经用于抗体的生产（Lindley et al. 2000；Tami et al. 2000，2004；Kaba et al. 2003），证明 BDVS 是一种可以用于快速生产单克隆抗体的多功能工具。

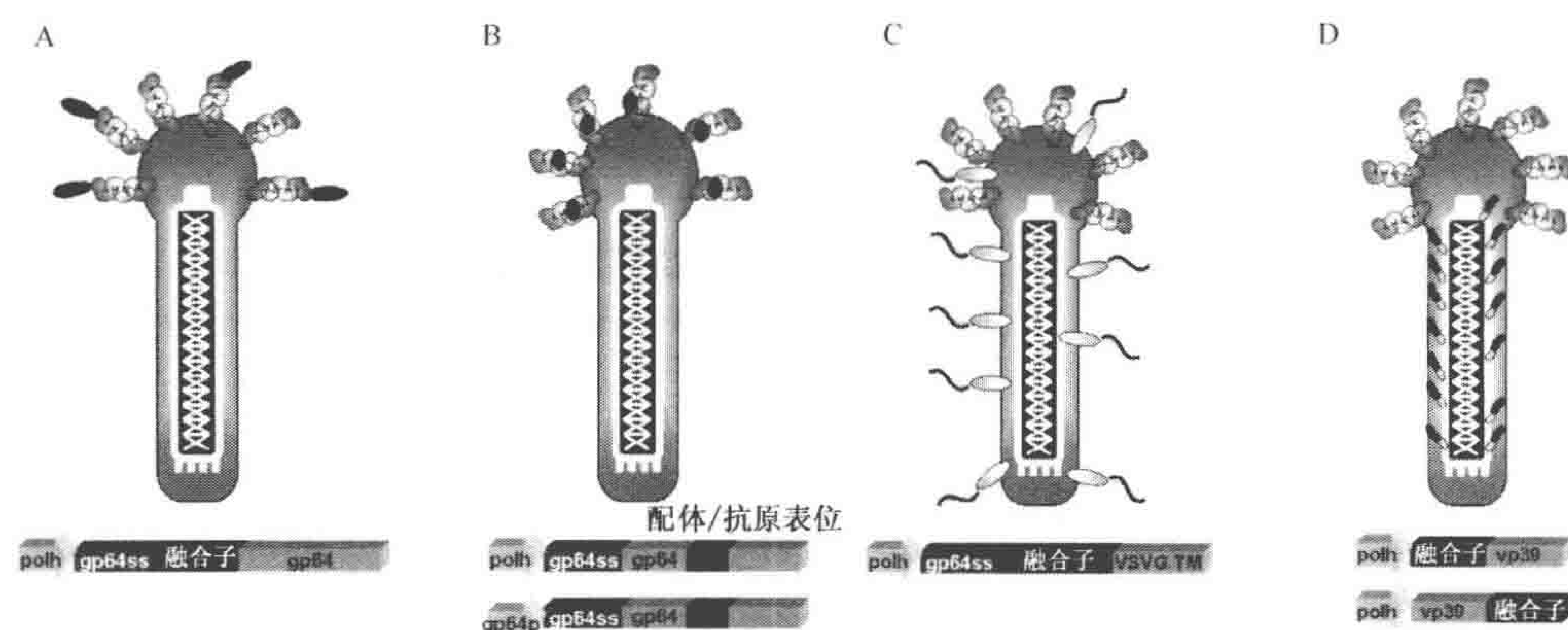



图 1. 不同的杆状病毒展示策略示意图。A. 外源多肽或蛋白质可以在融合到 *Ac*MNPV 主要包膜蛋白 gp64 或截短型的 gp64 第二个拷贝的氨基端被展示出来。B. 插入肽段的编码序列可以放置于天然的或是另外加的 gp64 的编码序列中，且这个经过改造的蛋白质分别受到 gp64 启动子（这里天然编码 gp64 的序列被省略）或 polh 启动子的调控。C. 目的蛋白质可以和异源膜蛋白融合，如 VSV 糖蛋白，或是与其膜锚定结构域融合，这样使得重组蛋白质能够在病毒颗粒表面大量而分散地分布。D. 在杆状病毒衣壳展示策略中，融合伴侣被置于主要衣壳蛋白 vp39 的氨基端或是羧基端，使融合子的部分能够有效整合到衣壳结构中。gp64：*Ac*MNPV 衣壳糖蛋白；gp64p：gp64 启动子；gp64ss：gp64 信号序列；polh：多角体蛋白启动子；vp39：*Ac*MNPV 衣壳蛋白；VSVG TM：VSV-G 蛋白膜锚定结构域。

## 通过选择性膜锚定子的表面展示

尽管外源蛋白质序列主要是通过和 gp64 融合以展示在病毒表面的，其他的病毒糖蛋白也可被用作相同用途。天然的和被截短型的疱疹口炎病毒 G 蛋白已经被运用于假型杆状病毒从而改变病毒的针对性（图 1C）。VSV-G 能增强病毒在哺乳动物细胞中的转导（Ba rsoum et al. 1997；Park et al. 2001；Pieroni et al. 2001；Tani et al. 2003；Kitagawa et al. 2005；Kaikkonen et al. 2006），并且能通过恢复 gp64-缺陷型病毒的装配及产生传染性病毒子代的能力来替代 gp64 的功能（Manger et al. 2001）。而且，现在已经可以成功地运用 VSV-G 假型杆状病毒表达丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 以诱导体液和细胞介导的免疫反应。VSV-G 的跨膜锚定子也被用于增强型绿色荧光蛋白（EGFP）（Chapple and Jones 2002）以及蛋白 A 的 IgG-结合 ZZ 结构域在病毒表面的表达（Fac-

ciabene et al. 2004)。为了获得杆状病毒的癌细胞选择趋向性，一些肿瘤导向肽通过融合到 VSV-G 的膜锚定域而展示在杆状病毒表面（Makela et al. 2006）。为了增加特异性，VSV-G 融合策略又做了进一步的修改，一个含 21 个氨基酸的能够介导杆状病毒载体的非特异性结合和转导的 VSV-G 膜外结构域的删除（Ojala et al. 2004；Kaikkonen et al. 2005）。这些载体表现出明显改善的与人乳腺癌细胞及肝癌细胞结合和转基因的能力，更加突出了靶向杆状病毒载体在癌症基因治疗中的潜能。这些策略由于散布在表面的两种融合伴侣，相对于单一的 gp64 融合，可以正常地聚集在病毒颗粒的极端从而增强展示的效果。除了 I 类跨膜 VSV-G 之外，II 类膜蛋白（流感病毒神经氨酸酶）的跨膜区域可作为氨基端锚定域以在病毒表面高效展示 EGFP（Borg et al. 2004）。BDVS 也可以用于在出芽病毒颗粒表面进行细胞膜蛋白的功能性展示（Loisel et al. 1997；Masuda et al. 2003；Urano et al. 2003）。

### 与 vp39 融合的衣壳展示

通过将 EGFP 融合到 vp39 的氨基或羧基端，能够成功地将嵌合在病毒衣壳上的外源蛋白质展示出来（图 1D）（Kukkonen et al. 2003）。这一策略有助于病毒衣壳的特异的胞内和核内的靶向性，从而使更详细的关于在哺乳动物细胞中杆状病毒的进入以及入核的机制研究成为可能。事实上，这项研究提出了哺乳动物细胞转导的一个障碍是由于细胞质运输和入核，而不是像先前认为的由于病毒从内含体中逃脱造成的（Boublik et al. 1995；Boyce and Bucher 1996）。

### 展示文库的建立

作为同源重组的替代，目的基因可以直接插入到杆状病毒基因组内（Kitts et al. 1990；Ernst et al. 1994；Lu and Miller 1996）。直接克隆会导致重组体数目的增加。直接插入是构建基因表达文库的首选方法，这种方法只需一步就能产生最大可能的库容。当主要的目的是为了获得大量的子代克隆（如通过同源重组产生 $10^3$～$10^5$ 的克隆），克隆效率（例如，高百分比的被酶切的质粒和插入片段，完好的 DNA 末端以及高纯度的试剂）就显得特别的重要（Ernst et al. 1998）。同时克隆大量的基因是构建一个多样性的重组文库的基础。根据选择标准，挑选出最适合的克隆。这个策略可以用于获得诸如抗体片段之类的多种多样的结合蛋白。通过亲和筛选，一个特异性的结合蛋白被选择出来，并且编码这个蛋白质的序列也通过病毒的增殖来被扩增。一个用杆状病毒感染的 *Sf*9 细胞株作表面展示和文库筛选的例子就是 gp41 来源的 HIV-1 抗原表位和流感病毒血凝素联合表达。这作为文库被展示在杆状病毒感染的昆虫细胞表面，文库中的每个克隆包含了不同的与抗原表位邻近的氨基酸。这样就可以让结构环境发生改变，使得抗原表位以最容易接近的方式呈现出来，从而增加了单克隆抗体 2F5 与之结合的能力（Ernst et al. 1998）。

## 方案 1

## 构建杆状病毒展示文库

杆状病毒展示载体系统较原核系统有更多的优点。杆状病毒容许更大的基因片段的

插入，更简单的扩增，还可以繁殖至高的滴度。而且，真核系统容许翻译后修饰，以及能够增强靶向的特异性的病毒衣壳的表面修饰。最后，这种改良的病毒有能力转导更多样的分裂和不分裂的哺乳动物细胞。然而，尽管病毒在哺乳动物细胞中不复制，它们也并不是完全的转录沉默。病毒在体内同样存在很强的抗原性，这限制了它的治疗用途。在本方案中用到的杆状病毒载体 *Ac*-omega 是源于在多角蛋白启动子下游含有一个独特的限制酶（*Sce*I）酶切位点的野生型的 *Ac*MNPV，通过该位点可以将载体线性化，并指导插入片段的连接（图 2）（Ernst et al. 1994）。

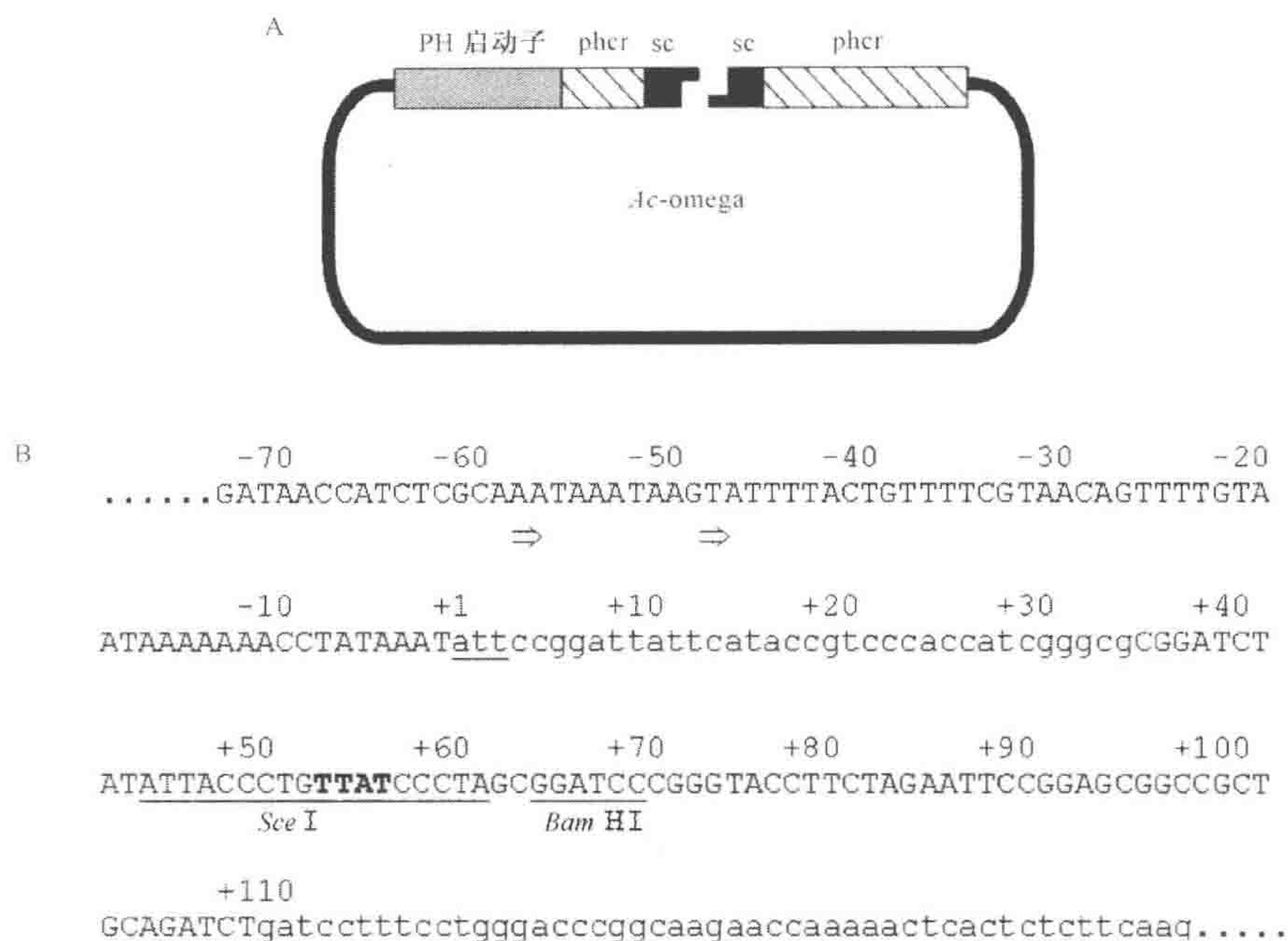



图 2. A. 经过 *Sce*I 巨大核酸酶处理过用于 DNA 片段直接基因插入的包含 *Sce*I 单切割位点（sc）的 *Ac*-omega 示意图。多角蛋白启动子（PH 启动子）、编码多角蛋白的残基（phcr）和 *Ac*-omega 上的多克隆位点来自于转移载体 pVL1393。B. *Ac*MNPV 衍生物 *Ac*-omega 在 I-*Sec*I 识别位点的核酸序列包含了多角蛋白启动子区及 5′端和 3′端的多角蛋白编码残基。箭头（−57）所指为 mRNA 的 5′端。箭头（−48）所指为转录起始位点。天然多角蛋白的 ATG 突变为 ATT（+1，画线部分）。从+1～+35 位的小写字母表示 5′端的多角蛋白编码残基。18bp 长的 I-*Sec*I 识别位点横跨+45～+62（下画线部分）。4 个碱基的 I-*Sec*I 3′端非回文突出端用黑体字标注。目的基因插入位点（只能单向地插入）位于+58 位。+65～+110 的核酸序列来自于转移载体 pVL1393 的多克隆位点。+111 位点开始是天然多角蛋白基因 3′端多角蛋白编码区的+172 位（小写字母）。

## 材料

**注意**：标有 < !>的材料的处理方法见附录。

## 试剂

小牛肠碱性磷酸酶

DNA，*Ac*-omega 杆状病毒 DNA 和待插入的目的片段

乙醇（70%）<!>

IPL-41（粉状培养基，pH6.2±0.1，渗透压约 400mOsmol）

脂质体制剂（Cellfectin；Invitrogen ）

苯酚：氯仿<!>

磷酸盐缓冲液（PBS）

- 2.7mmol/L KCl
- 1.5mmol/L $KH_2PO_4$<!>
- 136.9mmol/L NaCl
- 8.9mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$<!>
- 4℃储存。

I-*Sce*I 大范围核酸酶（Boehringer-Mannheim）

*Sf*9 昆虫细胞（ATCC，CRL-1711）

*Spodoptera frugiperda*（*Sf*9）

## 仪器

贴壁细胞培养耗材：T 培养瓶、多孔培养板、培养皿

细胞培养箱（27～28℃）

一次性用品：一次性试管、微量移液器、tip 头、无菌过滤器

其他设备：层流罩、水浴锅、大容量离心机（>100ml），Spinner 瓶

## 方法

1. 用 100μl 试剂供应商推荐的缓冲液稀释 10μg 的 *Ac*-omega 病毒 DNA，加入 50 单位的 I-*Sce*I 大范围核酸酶，置于 37℃孵育 5h。
2. 用小牛肠碱性磷酸酶处理已经线性化的病毒 DNA，除去 5′端的磷酸基团。
3. 苯酚：氯仿抽提 DNA。
4. 乙醇沉淀 DNA。
5. 以摩尔数比为 1：40 的比例将待插入片段和 100～200ng 经过纯化和去磷酸化的 *Ac*-omega病毒 DNA 连接（详见 Ernst et al. 1994）。
6. 连接混合物置于 16℃孵育过夜。
7. 往连接混合物中加入 20μl Cellfectin（100μl 体系），室温孵育 15min。
8. 用上一步的得到的脂质体/连接复合物转染 $2.5\times10^6$ 个 *Sf*9 细胞。孵育 6h。
9. 加入含血清的培养基，27℃培养 4～6d。
10. 进行蚀斑分析并通过荧光识别的细胞分选仪分析外源蛋白质在细胞表面的表达（FACS；Ernst et al. 1998）。

## 方案2

# 重组展示病毒滴度的检测

杆状病毒的滴度可以用诸如经典的蚀斑法或终点稀释法这些标准的方法来检测(Summers and Smith 1987；King and Possee 1992；O'Reilly et al. 1994)。然而，这些方法费时费力，下面介绍一个快速的方案（由 Volkman and Goldsmith 1982；BD Biosciences Clontech 2003 改进而来)。该方案通过直接检测病毒特异性的启动子控制下的报道基因，如 GFP 和β-半乳糖苷酶，或者是用抗杆状病毒的特异性抗体（如抗-gp64 的抗体）来间接检测病毒滴度。

## 材料

**注意**：标有 <!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

抗体

　　羊抗鼠辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗

　　使用前按 1：400 用 PBS-Tween 稀释。

　　鼠源性抗-gp64 抗体

　　使用前用 PBS-T 稀释。

杆状病毒

蓝辣根过氧化物酶底物

乙醇<!>

固定剂（formyl-buffered acetone）

　　30% PBS

　　45% 丙酮 <!>

　　25% 福尔马林（稀释自 37%的甲醛）<!>

　　　每片 500μl，根据需要固定的量在使用前配制。

盐酸 <!>

去离子水

无血清昆虫细胞培养基（如 HyQ SFX [HyClone], In sect Xpress [Biowhittaker], 或 *Sf*-900 II SFM [Invitrogen]）

甲基纤维素（0.6% *m/V*）溶于昆虫细胞培养基

　　高温灭菌甲基纤维素，再加入培养基，搅拌过夜。

封片液（如 Mowiol；Calbiochem）

正常山羊血清（NGS）

　　使用前用 PBS-Tween 以 1：30 比例稀释。

PBS/Tween（PBS-T，0.05%Tween 20）

磷酸盐缓冲液（PBS）

*Spodoptera frugiperda*（*Sf*9）细胞株（ATCC，CRL-1711）

### 仪器

显微镜载玻片（12 孔；如 Cel-line）

## 方法

1. 将载玻片放入 70% 乙醇和 1% HCl 的溶液中浸泡过夜。自来水冲洗 10 次，去离子水冲洗 3 次，80℃孵育过夜。
2. 收集对数生长期的 *Sf*9 细胞，使其密度在 $1.5\times10^6$ 个/ml。
3. 向载玻片的每个孔加入 30μl *Sf*9 细胞。置于增湿孵化器，28℃孵育 30～60min，让细胞附着于载玻片上。
4. 用培养基稀释杆状病毒

   $10^{-5}$、$10^{-6}$ 和 $10^{-7}$ 最终稀释已经足够用于滴度检测。
5. 小心地将培养基从培养细胞上移去，每孔接种 10μl 杆状病毒。每个稀释浓度 4 个孔，并且再做一个复本（如每个样品做两个片）。
6. 增湿孵化器内 28℃孵育 1h。
7. 除去接种物，每孔加入 40μl 甲基纤维素。
8. 用潮湿的纸巾包裹好载玻片放入塑料袋中密封，28℃孵育 2～3d。
9. 每孔加入 40μl 固定剂。室温孵育 5～10min。

   不要过度固定，除去甲基纤维素也是没有必要的。
10. 除去固定剂，用 PBS-Tween 洗涤载玻片 3 次，每次 5min。
11. 除去 PBS-Tween，每孔加入 40μl 稀释的 NGS，室温孵育 5min。
12. 除去 NGS，每孔加入 15μl 鼠源抗 gp64 抗体，室温孵育 30min。
13. 除去一抗，PBS-Tween 洗涤 2 次，每次 5min。
14. 除去 PBS-Tween，每孔加入 15μl 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体，室温孵育 25min。
15. 除去二抗，PBS-Tween 洗涤 3 次，每次 5min。
16. 每孔加入 15μl 过氧化酶底物，显色 1～3h。
17. 吸走底物，让载玻片风干。
18. 将干燥后的样品封片。

    干燥的载玻片通常能够在黑暗环境下保存 1～2 周。
19. 用光学纤维镜对孔内的染色焦点（4～30 个被染色的细胞形成的不连续的细胞簇）计数，每个孔有 5～25 个焦点。
20. 对于每个稀释浓度，确定每个孔染色焦点数的平均值。
21. 用焦点的平均数乘以相应的稀释因子和接种正常化因子 100，得到病毒滴度。

    病毒滴度（pfu/ml）＝每孔中焦点的平均数×1/稀释因子×100。

## 方案 3

# 被感染昆虫细胞表面展示的病毒蛋白质的免疫荧光分析

在生产出展示病毒后，进行下一步的实验前，确认病毒颗粒表面是否有待展示的多肽或蛋白质存在及其功能如何是非常重要的。因此，对于被感染的细胞和出芽的病毒颗粒可以通过若干利用合适抗体进行检测的方法进行分析，如蛋白质印迹（Western blot）、酶联免疫检测（ELISA）（Ojala et al. 2001，2004）、免疫荧光分析（IF）、免疫电镜（IEM）、荧光相关光谱（Toivola et al. 2002）、流式细胞仪和原子力显微镜。下边将介绍两个标准方法，IF 和 IEM 的详细方案。

## 材料

**注意**：标有 <!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

抗体

针对目的蛋白或多肽的一抗

荧光接合的二抗（如 Alexa Fluor Dyes；Invitrogen）

杆状病毒：重组展示和野生型

3%牛血清白蛋白（BSA）的 PBS 溶液

DABCO（25mg/ml 溶于 Mowiol 中，Sigma-Aldrich）

昆虫细胞生长培养基（无血清）

Mowiol（Calbiochem）

4%多聚甲醛（溶于 PBS）<!>

*Spodoptera frugiperda*（*Sf*9）细胞株（ATCC，CRL-1711）

悬浮生长的细胞在转染时细胞密度大约为 $2\times10^6$ 个/ml。

Triton X-100<!>

### 仪器

细胞培养箱（如用于悬浮细胞培养的旋转培养瓶）

盖玻片

小型离心机

显微镜载片

细胞培养所需的塑料器皿和移液器

## 方法

1. 用重组和野生型病毒（对照）感染约 10ml 的 *Sf*9 细胞，感染复数（moi）为 5～10。

于 28℃旋转摇床转速 125r/min 培养 24～28h。

2. 从每个感染组中收取 0.5～1ml 细胞（$1\times10^6$ 个或 $2\times10^6$ 个），于 4℃，2000r/min 离心3～4min。
3. 吸去培养基，用 0.5～1ml 预冷的 PBS 小心重悬细胞。
4. 于 4℃，2000r/min 离心 3～4min，吸去培养基。
5. 可选步骤，细胞可以经过固定和（或）封闭和渗透处理。

   a. 0.5～1ml 4%多聚甲醛孵育。

   b. 4℃振荡 20min。

   c. 于 4℃，2000r/min 离心 3～4min，吸去固定剂。

   作为选择，免疫标记后可以对样品进行固定（步骤 10 后）。如果展示的蛋白质具有荧光，则直接进行步骤 11。

   d. 室温下，用 0.1% Triton X-100-BSA 封闭和渗透细胞 10min。

   如果一抗识别的展示蛋白质的抗原表位位于细胞外，则没有必要对细胞进行渗透处理。另外，一些识别跨膜蛋白质的胞质结构域的抗体能够不需要渗透处理就能够穿过细胞膜。

6. 用 PBS 稀释的一抗孵育细胞，4℃振荡 1h。

   每 $1\times10^6$～$2\times10^6$ 个细胞大约用 200μl。

7. 4℃，0.5～1ml PBS 振荡洗涤细胞三次，每次 15min。在每次洗涤细胞后2000r/min，4℃离心 3min。
8. 加入适量 PBS 稀释的荧光标记的二抗，4℃避光振荡孵育 30min。

   每 $1\times10^6$～$2\times10^6$ 个细胞大约用 200μl。

9. 4℃，0.5～1ml PBS 振荡洗涤细胞三次，每次 15min。在每次洗涤细胞后2000r/min，4℃离心 3min。
10. 吸去上清，用 30～50μl DABCO 重悬细胞。
11. 将几微升的细胞悬液转移到载玻片，盖上盖玻片，干燥，暗处 4℃保存。

    因为在操作过程中细胞数量会减少 20%～50%，根据最后的细胞数量调整 DABCO 的体积。

12. 用普通荧光显微镜或者是激光共聚焦显微镜分析细胞。

## 方案 4

# 重组展示病毒的免疫电镜分析

此方法在封口膜上使用适当体积的染色剂形成的液滴上进行。通常将格栅浮于液滴上（样品面向下），从而避免没有包被的格栅背面被非特异性标记。不要让格栅背面湿润或是在孵育前使之完全干燥。下面的方案会给出推荐的孵育时间，但是确切的时间，以及抗体和蛋白-A-结合金颗粒的稀释倍数，需要在每次实验根据经验来确定。

## 材料

**注意**：标有 <!>的材料的处理方法见附录。

## 试剂

抗体

针对目的蛋白质或多肽的一抗

二抗（可选）

杆状病毒（蔗糖梯度纯化；Summers and Smith 1987；King and Possee 1992；O'Reilly et al. 1994）

去离子蒸馏水

使用前 0.22μm 滤器过滤除菌。

10%胎牛血清（FBS）稀释于 PBS 溶液

使用前 0.22μm 滤器过滤除菌。

固定剂（可选）：1%戊二醛/4%多聚甲醛的 PBS 溶液或 2.5%戊二醛的 PBS 溶液<!>

使用前用 0.22μm 滤器除菌。

0.15%甘氨酸的 PBS 溶液<!>

使用前用 0.22μm 滤器除菌。

甲基纤维素/乙酸双氧铀溶液<!>

在 20ml 沸腾的双蒸水中加入 0.3g 的甲基纤维素，冰浴搅拌 4～8h，然后加入 80mg 乙酸双氧铀，4℃放置至少 24h，4℃保存备用。

磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4～7.5）

使用前用 0.22μm 滤器除菌，4℃保存。

蛋白-A-结合的纳米金颗粒（直径 5～10nm）。

## 仪器

包被了碳和 Formvar 树脂的金属格栅

滤纸

滤器（0.22μm）

封口膜（Parafilm）

注射器

## 方法

1. 用 PBS 将病毒稀释到合适的浓度。
   a. 确定格栅上病毒的最适密度，用 PBS 5 倍或 10 倍梯度（如未稀释、$10^{-1}$、$10^{-2}$、$10^{-3}$）稀释病毒。

      可选步骤，用 0.22μm 滤器过滤稀释的样品，让聚集病毒颗粒充分散开。

   b. 等分稀释好的样品，各 10μl 加到每个格栅上，使病毒颗粒与之接触。

   c. 用步骤 10 的方法进行对比和包埋。可以风干。

   d. 电子显微镜观察格栅。
2. 取 10μl 最适稀释倍数的病毒（由步骤 1 确定的）到格栅上，室温放置 10～60min。

最后格栅上病毒的密度取决于孵育的时间。

作为可供选择的步骤，样品可以和固定剂混合，或者是在步骤 8 以后固定。

3. 室温下，10min 内用 0.15% 甘氨酸洗涤格栅 4 次。
4. 用 10% FBS 封闭非特异性结合位点，室温，10min。用滤纸吸走多余液体。
5. 加入 10% FBS 稀释的一抗，室温孵育 15～60min。

   每块格栅需要 5～10μl。

6. 室温下，15min 内用 10% FBS 或 0.15% 甘氨酸洗涤 5 次。用滤纸吸走残余液体。

   作为可供选择的步骤，室温下用稀释于 10%胎牛血清的桥接抗体孵育 15～60min。按步骤 7 的描述洗涤。这种方法只有当一抗和蛋白 A 的结合能力很弱（如绵羊和山羊 IgG 和一些单克隆抗体）或为增强所需的金的信号时才使用。

7. 加入 10% FBS 稀释的蛋白-A-结合纳米金颗粒，室温孵育 30～60min。

   每块格栅需要 5～10μl。

8. 室温下，20min 内用 10% FBS 或 0.15% 甘氨酸洗涤 8 次。
9. 室温下，8min 内用双蒸水洗涤 4 次。

   作为可供选择的步骤，室温下用甲基纤维素/乙酸双氧铀负染色格栅 30s，并使之风干。

10. 冰上用预冷的甲基纤维素/乙酸双氧铀溶液孵育样品，每 10s 换一次液，换 2 次液。
11. 将格栅转移到甲基纤维素/乙酸双氧铀溶液的第三个液滴上，冰上孵育 10min。
12. 从液滴上将格栅取出，用滤纸吸去甲基纤维素/乙酸双氧铀溶液使之变薄成膜，风干 10min 以上。
13. 用透射式电子显微镜观察纳米金颗粒的分布情况，从而获得病毒颗粒的数据。

## 方案 5

# 杆状病毒介导的基因递送效率的监测

萤光素酶分子在哺乳动物细胞中没有毒性，并且其发射的荧光和其数量呈线性关系。因此，这里提供了一个灵敏、快速且不需要外部激发光源的定量检测转基因表达的方法。

## 材料

**注意**：标有 <!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞生长培养基（完全培养基，无血清和选择性培养基）

D-萤光素：0.6mmol/L D-萤光素溶于 0.6mol/L 柠檬酸钠缓冲液中（pH5.0）<!>（Sigma-Aldrich）

分装，每管 2ml，－20℃保存。在使用时，以 1∶5 用水稀释。一旦解冻，溶液在 4℃可以保存几天。

哺乳动物细胞（如人肝细胞系 HepG2）

磷酸盐缓冲液（PBS）

## 仪器

细胞培养皿

荧光计数仪

不透明 96 孔板（白色或黑色）

## 方法

1. 在 60mm 培养皿中种入 $1\times10^6$ 个细胞，37℃，5%$CO_2$ 孵育 18～24h。

   用于荧光素监测的初始细胞数取决于实验所用的细胞系、重组杆状病毒以及荧光计数仪的检测灵敏度。

2. 将病毒以 100pfu/个细胞的量稀释到 1ml 无血清培养基中。

   没有纯化过的或是经蔗糖梯度纯化的病毒也可以用于试验。注意，用传统的蚀斑形成法测定的病毒滴度只能说明在昆虫细胞中杆状病毒的感染率，所以，病毒滴度并不代表其在哺乳动物细胞中的感染率。因此，我们推荐运用实时定量 PCR 来获得准确的病毒数（Lo and Chao 2004）。

3. 将培养基从培养皿中吸出，将病毒加入到培养皿中，37℃，5%$CO_2$，培养 1h。

4. 加入 4～5ml 含 10%胎牛血清的完全培养基，37℃，5%$CO_2$，孵育 24～48h。

   不需要除去接种的病毒。若需替代转导方案，请参考第二十九章的内容。

5. 吸去培养基，用 PBS 清洗细胞。

6. 胰酶消化或是细胞刮刀刮取细胞，将细胞转入离心管。

7. 1500r/min 离心 3min，用 100μl 完全培养基或 PBS 重悬沉淀。

8. 将细胞悬液转入白色或黑色的 96 孔板上，每孔加入 100μl 萤光素（pH5.0），快速混匀。

   细胞不需被裂解。

9. 在加入了萤光素酶底物后，立即用荧光计数仪测量萤光素酶的酶活性。

## 致谢

感谢加利福尼亚大学伯克利分校 Loy Volkman 教授的为本章做出的巨大贡献。

## 参考文献

Airenne K.J., Peltomaa E., Hytonen V.P., Laitinen O.H., and Yla-Herttuala S. 2003. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **31:** e101.

Airenne K.J., Hiltunen M.O., Turunen M.P., Turunen A.M., Laitinen O.H., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2000. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* **7:** 1499–1504.

Barsoum J., Brown R., McKee M., and Boyce F.M. 1997. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2011–2018.

BD Biosciences Clontech. 2003. *BacPAK™ baculovirus rapid titer kit user manual.* Clontech, Mountain View, California.

Borg J., Nevsten P., Wallenberg R., Stenstrom M., Cardell S., Falkenberg C., and Holm C. 2004. Amino-terminal anchored surface display in insect cells and budded baculovirus using the amino-terminal end of neuraminidase. *J. Biotechnol.* **114:** 21–30.

Boublik Y., Di Bonito P., and Jones I.M. 1995. Eukaryotic virus display: Engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology* **13:** 1079–1084.

Boyce F.M. and Bucher N.L. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 2348–2352.

Chapple S.D. and Jones I.M. 2002. Non-polar distribution of green fluorescent protein on the surface of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus using a heterologous membrane

anchor. *J. Biotechnol.* **95:** 269–275.

Condreay J.P., Witherspoon S.M., Clay W.C., and Kost T.A. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 127–132.

Ernst W.J., Grabherr R.M., and Katinger H.W. 1994. Direct cloning into the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus for generation of recombinant baculoviruses. *Nucleic Acids Res.* **22:** 2855–2856.

Ernst W.J., Spenger A., Toellner L., Katinger H., and Grabherr R.M. 2000. Expanding baculovirus surface display. Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur. J. Biochem.* **267:** 4033–4039.

Ernst W., Grabherr R., Wegner D., Borth N., Grassauer A., and Katinger H. 1998. Baculovirus surface display: Construction and screening of a eukaryotic epitope library. *Nucleic Acids Res.* **26:** 1718–1723.

Facciabene A., Aurisicchio L., and La Monica N. 2004. Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *J. Virol.* **78:** 8663–8672.

Grabherr R. and Ernst W. 2001. The baculovirus expression system as a tool for generating diversity by viral surface display. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **4:** 185–192.

Grabherr R., Ernst W., Oker-Blom C., and Jones I. 2001. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol.* **19:** 231–236.

Grabherr R., Ernst W., Doblhoff-Dier O., Sara M., and Katinger H. 1997. Expression of foreign proteins on the surface of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechniques* **22:** 730–735.

Hoare J., Waddington S., Thomas H.C., Coutelle C., and McGarvey M.J. 2005. Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice. *J. Gene Med.* **7:** 325–333.

Hüser A. and Hofmann C. 2003. Baculovirus vectors: Novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications. *Am. J. Pharmacogenomics* **3:** 53–63.

Hüser A., Rudolph M., and Hofmann C. 2001. Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nat. Biotechnol.* **19:** 451–455.

Kaba S.A., Hemmes J.C., van Lent J.W., Vlak J.M., Nene V., Musoke A.J., and van Oers M.M. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria parva* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Eng.* **16:** 73–78.

Kaikkonen M.U., Räty J.K., Airenne K.J., Wirth T., Heikura T., and Yla-Herttuala S. 2006. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **13:** 304–312.

King L.A. and Possee R.D. 1992. *The baculovirus expression system*, 1st edition. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. 2005. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* **79:** 3639–3652.

Kitts P.A., Ayres M.D., and Possee R.D. 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids. Res.* **18:** 5667–5672.

Kost T.A. and Condreay J.P. 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.* **20:** 173–180.

Kost T.A., Condreay J.P., and Jarvis D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **23:** 567–575.

Kukkonen S.P., Airenne K.J., Marjomaki V., Laitinen O.H., Lehtolainen P., Kankaanpaa P., Mahonen A.J., Räty J.K., Nordlund H.R., Oker-Blom C., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2003. Baculovirus capsid display: A novel tool for transduction imaging. *Mol. Ther.* **8:** 853–862.

Lehtolainen P., Tyynela K., Kannasto J., Airenne K.J., and Yla-Herttuala S. 2002. Baculoviruses exhibit restricted cell type specificity in rat brain: A comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intracerebral gene transfer in vivo. *Gene Ther.* **9:** 1693–1699.

Li Y., Wang X., Guo H., and Wang S. 2004. Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. *Mol. Ther.* **10:** 1121–1129.

Lindley K.M., Su J.L., Hodges P.K., Wisely G.B., Bledsoe R.K., Condreay J.P., Winegar D.A., Hutchins J.T., and Kost T.A. 2000. Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. *J. Immunol. Methods* **234:** 123–135.

Lo H.R. and Chao Y.C. 2004. Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Prog.* **20:** 354–360.

Loisel T.P., Ansanay H., St-Onge S., Gay B., Boulanger P., Strosberg A.D., Marullo S., and Bouvier M. 1997. Recovery of homogeneous and functional $\beta_2$-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. *Nat. Biotechnol.* **15:** 1300–1304.

Lu A. and Miller L.K. 1996. Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning. *Biotechniques* **21:** 63–68.

Luckow V.A., Lee S.C., Barry G.F., and Olins P.O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67:** 4566–4579.

Makela A.R., Matilainen H., White D.J., Ruoslahti E., and Oker-Blom C. 2006. Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *J. Virol.* **80:** 6603–6611.

Mangor J.T., Monsma S.A., Johnson M.C., and Blissard G.W. 2001. A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.* **75:** 2544–2556.

Markovic I., Pulyaeva H., Sokoloff A., and Chernomordik L.V. 1998. Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *J. Cell Biol.* **143:** 1155–1166.

Masuda K., Itoh H., Sakihama T., Akiyama C., Takahashi K., Fukuda R., Yokomizo T., Shimizu T., Kodama T., and Hamakubo T. 2003. A combinatorial G protein-coupled receptor reconstitution system on budded baculovirus. Evidence for $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ coupling to a human leukotriene $B_4$ receptor. *J. Biol. Chem.* **278:** 24552–24562.

Mottershead D., van der Linden I., von Bonsdorff C.H., Keinanen K., and Oker-Blom C. 1997. Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238:** 717–722.

Mottershead D.G., Alfthan K., Ojala K., Takkinen K., and Oker-Blom C. 2000. Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275:** 84–90.

Ojala K., Mottershead D.G., Suokko A., and Oker-Blom C. 2001. Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284:** 777–784.

Ojala K., Koski J., Ernst W., Grabherr R., Jones I., and Oker-Blom C. 2004. Improved display of synthetic IgG-binding domains on the baculovirus surface. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3:** 77–84.

Oker-Blom C., Airenne K.J., and Grabherr R. 2003. Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **2:** 244–253.

Oomens A.G., Monsma S.A., and Blissard G.W. 1995. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: Synthesis, oligomerization, and processing. *Virology* **209:** 592–603.

O'Reilly D.R., Miller L.K., and Luckow V.A. 1994. *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual.* Oxford University Press, New York.

Park S.W., Lee H.K., Kim T.G., Yoon S.K., and Paik S.Y. 2001. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289:** 444–450.

Peakman T.C., Harris R.A., and Gewert D.R. 1992. Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific in vitro recombination. *Nucleic Acids. Res.* **20:** 495–500.

Pieroni L., Maione D., and La Monica N. 2001. In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **12:** 871–881.

Räty J.K., Airenne K.J., Marttila A.T., Marjomaki V., Hytonen V.P., Lehtolainen P., Laitinen O.H., Mahonen A.J., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2004. Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol. Ther.* **9:** 282–291.

Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura

T., and Matsuura Y. 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* **78:** 2657–2664.

Spenger A., Grabherr R., Tollner L., Katinger H., and Ernst W. 2002. Altering the surface properties of baculovirus *Autographa californica* NPV by insertional mutagenesis of the envelope protein gp64. *Eur. J. Biochem.* **269:** 4458–4467.

Summers M.D. and Smith G.E. 1987. *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*, 2nd edition. Texas Agricultural Experiment Station, College Station, Texas.

Tami C., Farber M., Palma E.L., and Taboga O. 2000. Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. *Arch. Virol.* **145:** 1815–1828.

Tami C., Peralta A., Barbieri R., Berinstein A., Carrillo E., and Taboga O. 2004. Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on *SF9* cell and baculovirus surfaces. *Vaccine* **23:** 840–845.

Tani H., Limn C.K., Yap C.C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., and Matsuura Y. 2003. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77:** 9799–9808.

Toivola J., Ojala K., Michel P.O., Vuento M., and Oker-Blom C. 2002. Properties of baculovirus particles displaying GFP analyzed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biol. Chem.* **383:** 1941–1946.

Urano Y., Yamaguchi M., Fukuda R., Masuda K., Takahashi K., Uchiyama Y., Iwanari H., Jiang S.Y., Naito M., Kodama T., and Hamakubo T. 2003. A novel method for viral display of ER membrane proteins on budded baculovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308:** 191–196.

Volkman L.E. and Goldsmith P.A. 1982. Generalized immunoassay for *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infectivity in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **44:** 227–233.

Yap C.C., Ishii K., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Shimizu H., Ueno Y., Miyamura T., and Matsuura Y. 1997. A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology* **231:** 192–200.

# 第二十七章　通过重组杆状病毒安全、简单、高容量地把基因转运进昆虫和脊椎动物细胞

Kari J. Airenne[*], Olli H. Laitinen[*,‡], Anssi J. Mähönen[*,‡]和 Seppo Ylä- Herttuala[*,†]

[*] AI Virtanen Institute, Department of Biotechnology and Molecular Medicine and [†] Department of Medicine and Gene Therapy Unit, University of Kuopio, FI-70211 Kuopio, Finland;[‡] Ark Therapeutics Oy, Neulaniementie 2 L9, FIN-70210 Kuopio, Finland

何杰和吕青　译



## 摘要

杆状病毒已经成为在真核细胞中表达重组蛋白质的标准工具。数千种胞内和分泌的蛋白质已经在昆虫细胞中成功表达。改造过的杆状病毒能够转导分裂的和不分裂的脊椎动物细胞，从而进一步扩大了杆状病毒表达载体系统（BEVS）的应用范围。这就为通用的表达方法提供了基础，能通过一步克隆允许目的基因在一些不同类型的宿主中表达。最近的发现证明杆状病毒能可以在哺乳动物中介导有效地基因递送。因为作为非哺乳类病毒，这类病毒无法在脊椎动物细胞中复制和表达病毒基因，所以，杆状病毒有成为有效的基因治疗载体的潜力。我们已经开发了一个改造的基于转座的系统（BV-boost），用这个系统获得重组的杆状病毒，从而避免了最初的基于转座的杆状病毒基因组在大肠杆菌中生产的缺点，让该系统成为了简便、快速和方便的病毒生产的技术。这个方法基于改造的供载体（pBVboost）和改进的在 *sac*B 基因突变的大肠杆菌中的杆状病毒基因组（杆粒，bacmids）选型方案。重组质粒能以大约 $10^7$ 个/$\mu g$ 供载体的频率

产生而没有明显的背景。因而能为进行高通量的筛选和基因表达，有效地组建 BVboost 系统。

## 引言

自 BEVS 被引入的 20 多年间，BEVS 成为了生产重组蛋白质最为流行的系统之一（Smith et al. 1983；O'Reilly et al. 1994；Kost et al. 2005）。改造的带有合适启动子的杆状病毒能够有效地转导肝细胞（Hofmann et al. 1995），这个发现激起了人们对于将 BEVS 作为可能的基因递送载体来转导非昆虫来源的细胞的兴趣。事实上，很多脊椎动物细胞能够被重组杆状病毒转导。这些病毒也能够介导有效的基因递送，在体内将目的基因送入不同哺乳动物的不同组织中（Sandig et al. 1996；Condreay et al. 1999；Airenne et al. 2000；Haeseleer et al，2001；Pieroni et al. 2001；Lehtolainen et al. 2002；Song et al. 2003；Leisy et al. 2003；Cheng et al. 2004；Hu 2005）。BEVS 系统之所以较其他表达系统受欢迎，是因为 BEVS 系统具有一些独特的性质，如安全性，可以容纳较大的插入基因片段和甚至在脊椎动物细胞中有较高的病毒载量时也只表现很低的细胞毒性（Kidd and Emery 1993；O'Reilly et al. 1994；Ghosh et al. 2002；Airenne et al. 2004；Kost et al. 2005）。

### 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（*Ac*MNPV）：BEVS 的主力军

杆状病毒是一个具有宿主限制性的由不同病毒构成的病毒群体，这些宿主通常是无脊椎动物，尤其是昆虫（Groner 1986）。杆状病毒还没有感染脊椎动物宿主的报道。杆状病毒的双链环状 DNA 基因组（80～200kb）装载在弹性的棒状衣壳中（Summers and Anderson 1972；Burgess 1977），病毒衣壳直径为 25～50nm，长为 200～320nm（Harrap 1972），并且，病毒衣壳随着膨胀而可以容纳大的 DNA 片段（Fraser 1986）。NPV I 型杆状病毒中研究得最为广泛的是苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（*Ac*MNPV）。其基因组全长序列（134kb）的测序工作已经完成，并预测病毒基因组中包含 154 个可读框（ORF）（Ayres et al. 1994）。涉及 *Ac*MNPV 包装的主要糖蛋白是 gp64。gp64 已经成功地用于在杆状病毒表面展示不同的肽段和蛋白质，从而研究蛋白质的功能，同时也提高了靶向病毒在脊椎动物中的转导（Boublik et al. 1995；Ojala et al. 2001；Oker-Blom et al. 2003；Raty et al. 2004；Mäkelä et al.，第二十八章）。*Ac*MNPV 通过胞吞作用进入细胞（Wang et al. 1997）。gp64 在病毒进入细胞时起关键作用，因为 gp64 介导了依赖于 pH 的 *Ac*MNPV 从内含体的逃脱作用（Blissard and Wenz 1992）。病毒和细胞表面结合以及从昆虫细胞表面出芽也需要 gp64（Oomens and Blissard 1999）。细胞表面与 *Ac*MNPV 结合和介导病毒进入细胞的分子目前还没有找到，但是病毒具有广泛的靶细胞，这提示了这种分子应该是细胞表面共同具有的分子，如整合蛋白、磷脂和硫酸乙酰肝素蛋白（Hynes 1992；Dui sit et al. 1999；Tani et al. 2001）。用于 *Ac*MNPV 增值的细胞系通常是 *Spodoptera frugiperda* 9（*Sf*9）（Vaughn et al. 1977）。

为了使重组蛋白质能够在昆虫细胞中表达，目的蛋白质的基因通常放到 *Ac*MNPV 的强多角启动子下游（*polh*）（O'Reilly et al. 1994）。然而，*polh* 启动子的应用可能会

受到某些方面的限制，因为启动子在感染后很长的时间才能够被激活，这时候宿主细胞的转录后修饰机制已经不能正常工作。已经遇到很多与 *polh* 启动子有关的问题，特别是在表达一些生物活性依赖与糖基化的蛋白质时更加明显（Kost et al. 2005）。一些较 *polh* 被激活的早的启动子有 *p*10 基因、主要衣壳蛋白基因（*vp*39）、基本 6.9kDa 蛋白尿基因（*cor*）和病毒 *iel* 基因（Miller 1993；O'Reilly et al. 1994）。在脊椎动物细胞中，需要用到诸如细胞巨化病毒（CMV）、鲁斯氏肉瘤病毒（RSV）或鸡 β-肌动蛋白（CAG）的启动子，因为在脊椎动物细胞中 *polh* 没有活性（Shoji et al. 1997；Airenne et al. 2004；Kost et al. 2005）。也可以用到组织特异性和可控的启动子（Park et al. 2001；Li et al. 2004，2005；McCormick et al. 2004 ）。

## 重组杆状病毒的结构

*Ac*MNPV 庞大的基因组限制了将目的基因直接克隆到病毒基因组中。同源重组的方法因此适合用来将外源基因插入到病毒基因组中（Smith et al. 1983）。实践中，靶基因被克隆到一个转移（donor）载体上，这个 donor 载体包含一个杆状病毒的启动子，在它的两侧都有来源于杆状病毒不重要位点的 DNA，如 *Ac*MNPV 的多角体蛋白基因（最常见的插入外源 DNA 的位点）。将病毒的 DNA 和转移载体共转染到昆虫细胞中，随后在昆虫细胞中发生重组。最初的同源重组方案仅能够获得 0.1%～1%的重组病毒。随后针对这个方案也做了一些改进，最近已经获得了超过 95%的重组病毒（Davies 1994；Jones and Morikawa 1996）。

然而，最常用的获得重组杆状病毒的方法是通过 Tn7 的位点特异性转座，将外源 DNA 插入到在大肠杆菌中繁殖的杆粒 DNA 中（杆状病毒基因组）。重组的杆粒在大肠杆菌中通过颜色（*lacZ*）来筛选，来自白色的单克隆并经过纯化的杆粒可以用来转染昆虫细胞（Luckow et al. 1993）。这个方法简单快速，因为它不用再做费时的斑点纯化。纯的重组病毒可以在 7～10d 内准备好。然而，最初的系统受到低效的选择方案的困扰，并且重组杆状病毒基因组的鉴定也受制于菌落扇形变异和多种菌落形态（Leusch et al. 1995）。我们构建了一个经过修改的 donor 载体（pVBboost），这个载体上带有一个突变的 *sacB* 基因以及一个阻滞大肠杆菌 DH10BacΔTn7 的 *att*Tn7（Airenne et al. 2003），从而避开了这些困难。重组杆粒以大约 $10^7$ 个/μg donor 载体的频率产生而没有明显的背景。这样方便了使用，同时，有效的 pBVboost 系统提供了高通量生产重组杆状病毒的基础并且也提供了一个更加方便的产生单一病毒的方法（图 1，见彩版）。pVBboost 的 tetrapromoter 变异体 pVBboostFG 能够通过对目的基因的一步克隆将目的基因在哺乳动物、大肠杆菌和昆虫细胞（也可在体内）内表达，因此，改进了功能基因组的方法（Laitinen et al. 2005）。本章提供了要在昆虫和（或）脊椎动物细胞中表达目的基因时如何通过 BVboost 系统准备重组杆状病毒的指导。

## 优点及限制性

因病毒基因组是在大肠杆菌 *E. coli* 中制备的，不需要进行噬斑筛选来获得纯的病毒克隆。用于这个方法的筛选方案保证了实际上所有获得的杆状病毒基因组都是重组的。这些特性也使 BVboost 系统受到高通量筛选方法的关注。杆状病毒介导的脊椎动

物细胞转导具有良好的耐受性，甚至在非常大剂量的病毒感染下（moi 10 000）（Aoki et al. 1999），也未见细胞病变的报道。然而，转基因的表达水平不同并且通常低于除了肝来源的细胞类型。

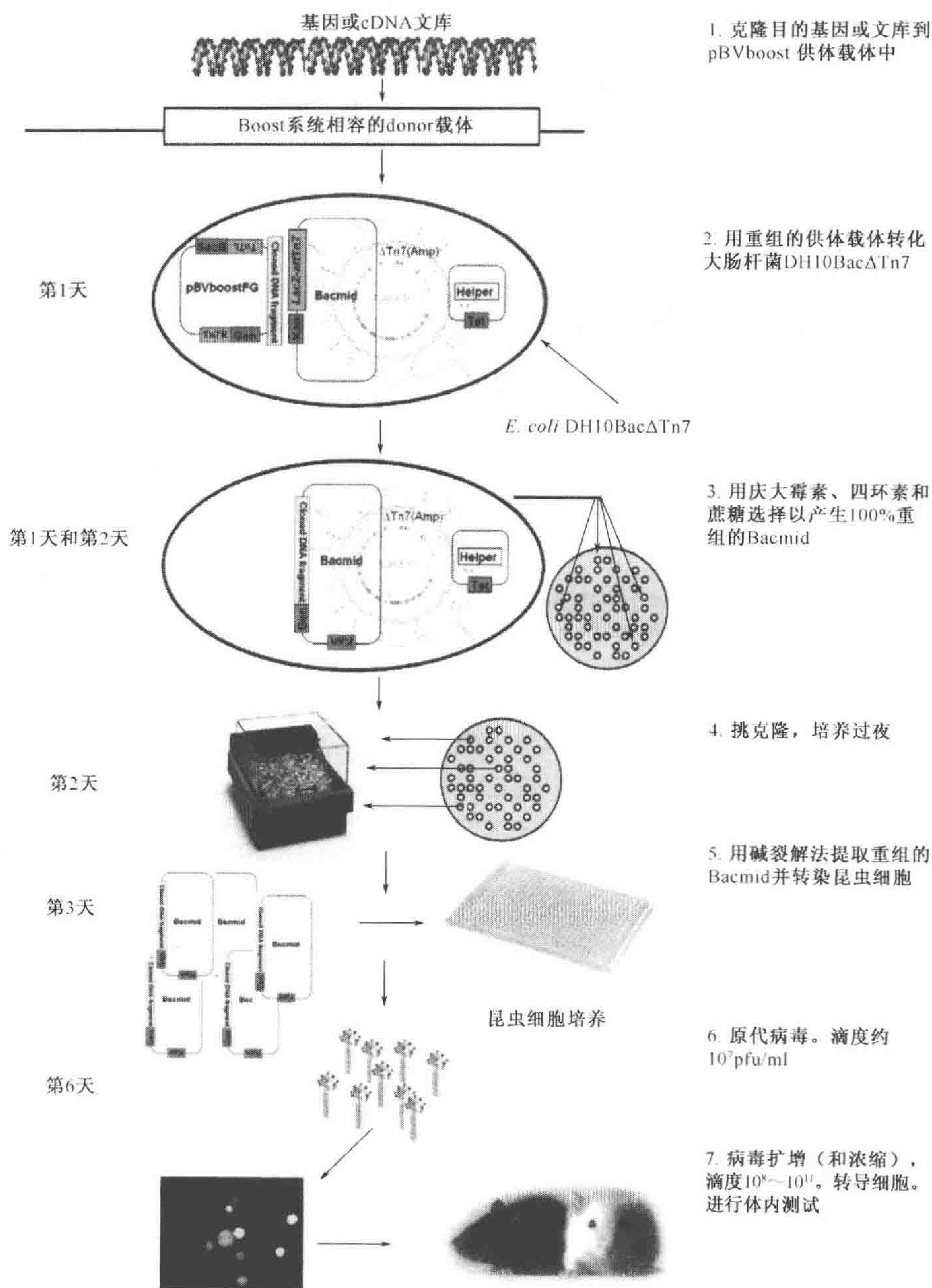



图 1. 用 pBVboost 系统克隆和产生重组杆状病毒的概略（Airenne et al. 2003）。

## 方案1

## 用BVboost系统制备重组杆状病毒

在将目的基因、cDNA或文库克隆到兼容BVboost系统的转移质粒后（图2）(Airenne et al. 2003；Laitinenet al. 2005)，通过将转移质粒电转化至DH10ΔBacTn7大肠杆菌中来制备重组杆状病毒基因组（图1，见彩版）。目的基因从转移载体转移到杆状病毒基因组（杆粒）是通过大肠杆菌中Tn7介导的位点特异性的转座反应发生的。筛选方案保证了所有克隆都符合要求。随后，用经过修改的针对大质粒的分离步骤，将重组杆状病毒基因组从大肠杆菌中提取出来。为了产生重组病毒，用分离出来的重组质粒去感染昆虫细胞。

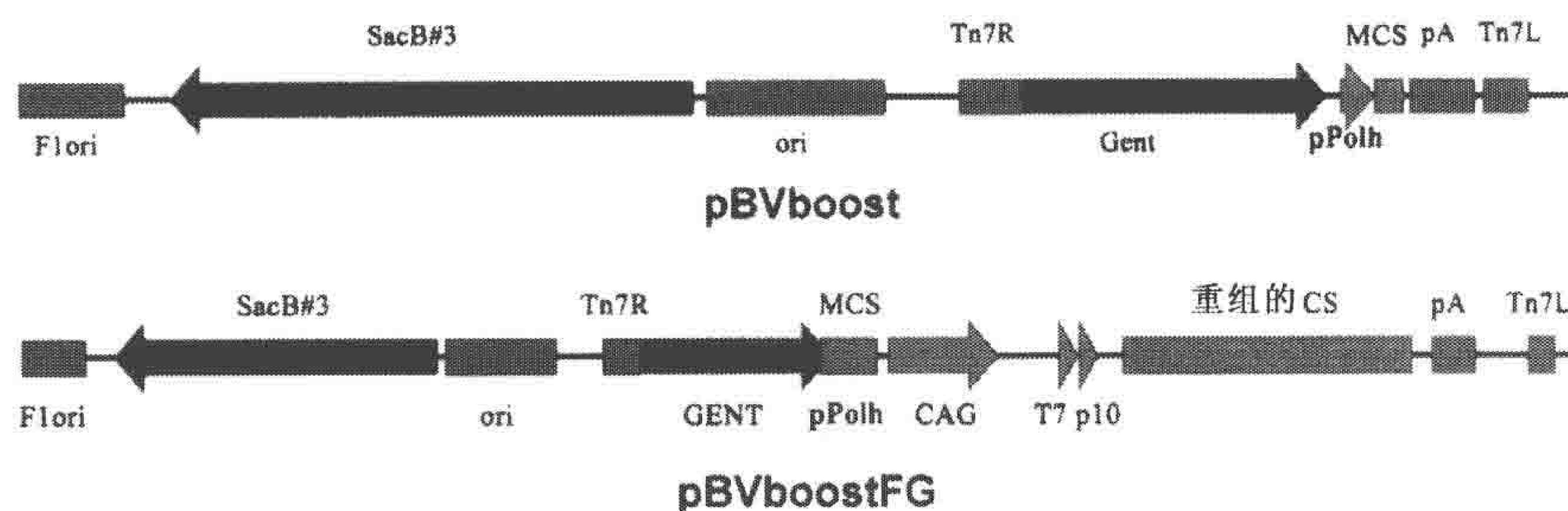



图2. boost供体载体pBVboost和pBVboostFG的示意图。(Flori) 纤毛噬菌体复制起点；SacB #3，果聚糖合酶基因的突变型；(ori) 细菌的复制起点；(Gent) 庆大霉素抗性基因；(Tn7R和Tn7L) TnT7细菌转座子的左、右末端；(pPolh) 杆状病毒多角启动子；(MCS) 多克隆位点；CAG，鸡β-actin启动子；(T7) 细菌噬菌体T7启动子；(p10) 杆状病毒p10启动子；(pA) 转录末端区域；(recombinational CS) λ噬菌体重组性克隆位点。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Bacto琼脂

Bluo-gal/X-gal（可选择）< !>

Boost溶液1

- 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0) < !>
- 10mmol/L EDTA
- 100μg/6ml RNase A < !>
- 过滤除菌，4℃储存。

Boost溶液2

- 0.2mol/L NaOH< !>
- 1%（*m*/*V*）SDS< !>

过滤除菌，室温储存。

Boost 溶液 3（3mol/L $KCH_3COO$，pH 5.5）

高温高压灭菌，室温储存。

细胞系

大肠杆菌 DH10BacΔTn7，用于电转的感受态细胞。

昆虫细胞 *Sf*9（ATCC CRL-1711）

Cellfectin（Invitrogen）

供体质粒（pBVboost 或其任意衍生物；图 2）

乙醇（70%）<!>

庆大霉素

无菌水

昆虫细胞生长培养液，无血清（例如，Insect Xpress [Biowhittaker] 或 Sf-900 II SFM [Invitrogen]）。

异丙醇<!>

IPTG（可选择）<!>

LB 培养液

10g bacto-胰蛋白胨

5g bacto-酵母提取物

10g NaCl

加水至 1L，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.5。

S.O.C. 培养基

2g bacto 胰蛋白胨

0.5g bacto 酵母提取物

1ml 1mol/L NaCl

0.25ml 1mol/L KCl<!>

1ml 2mol/L Mg 储存液（1mol/L $MgSO_4$，1mol/L $MgCl_2$）<!>

加水至 1L。

蔗糖

TE 缓冲液（pH 8.0）

四环素<!>

10mmol/L Tris-HCl

1mmol/L EDTA

## 仪器

用于大肠杆菌和昆虫细胞培养的培养箱

离心机

电转仪和电转杯

用于细胞培养塑料器皿和移液器

无菌试管

## 方法

### 大肠杆菌中杆状病毒基因组的转座

1. 准备 $LB_{stg}$-琼脂平板
   a. 将 7.5g 的 baco-琼脂加入到 100ml 5× LB 培养液中溶解，加水至 500ml。
   b. 高温高压灭菌。
   c. 在水浴中将温度平衡至 53℃。
   d. 加 10％的蔗糖、10μg/ml 四环素和 7μg/ml 庆大霉素。
   如果要通过颜色来筛选转座，加 100μg/ml Bluo-gal 或 60μg/ml X-gal 和 100mmol/L IPTG（步骤 9 和 11）。
   e. 倒平板。
   100ml $LB_{stg}$-琼脂足以倒 15 个平板。
2. 将可用于电转的 DH10BacΔTn7 大肠杆菌置于冰上，将冰浴的大肠杆菌等分并移至预冷的 EP 管，每份 40μl。
3. 5μl TE 中加入 1ng 供体质粒，然后再加入大肠杆菌中，轻轻混匀。
4. 将混合液转到预冷的电转杯中。根据设备说明进行电转。
5. 加入 1ml 室温的 S. O. C. 培养液到混合物中。
6. 将菌液转到 2ml EP 管，37℃，250r/min 振荡培养 4h。
7. 用 S. O. C. 培养液连续稀释菌液至 $10^{-1}$、$10^{-2}$、$10^{-3}$。
8. 将未稀释的和连续稀释的样品各取 100μl 到 $LB_{stg}$-琼脂板上，涂布均匀。
9. 将平板置于 37℃孵育 24h。
   板上的克隆带有重组杆状病毒基因组。转座可以通过含有 Bluo/X-gal 和 IPTG 的平板，并将孵育时间延长至 48h，最后通过颜色筛选来确定。

### 重组杆粒（杆状病毒基因组）DNA 的分离

10. 挑选克隆（接步骤 9）。在一个装有 5ml LB 培养液的 50ml Nunc 管中，加入 10μg/ml 四环素和 7μg/ml 庆大霉素和挑选的克隆。
11. 37℃，250r/min 振荡培养 16h。
    为了确定挑选适合的克隆，将克隆均匀涂布在含有 Bluo-gal 和 IPTG 的 $LB_{stg}$-琼脂平板上，37℃培养过夜。
12. 将 1ml 培养物移至新的 1.5ml 管中，14 000*g* 离心 1min。
13. 弃上清，用 300μl Boost 溶液 1 轻轻的反复吹打以重悬细胞。
14. 加入 300μl Boost 溶液 2，颠倒数次混匀，室温放置 5min。
15. 缓慢加入 300μl Boost 溶液 3，边加边轻轻混匀，冰上放置 5min。
    大肠杆菌基因组 DNA 和蛋白质的白色沉淀会在此步形成。
16. 14 000*g* 离心 10min。
17. 在新的 2ml 管中加入 0.8ml 无水异丙醇。
18. 将上清小心移入到有异丙醇的管子中，要避免取到白色沉淀。颠倒管子数次混匀。

冰上放置 5min。

19. 4℃，14 000$g$ 离心 15min。
20. 弃上清，每管中加入 1ml 70%乙醇，颠倒管子数次，以清洗沉淀。
21. 16℃，14 000$g$ 离心 15min。
22. 弃上清，晾干沉淀。
23. 40μl TE 溶液溶解 DNA，轻轻振荡使其溶解。

    沉淀可以置于冰箱中溶解过夜。如果不直接用于转染，杆粒 DNA 于－20℃保存，避免反复冻融。

## 重组杆粒 DNA 转染昆虫细胞以生产病毒

24. 在 6 孔培养板的每一个 35mm 孔中接种 $1.5\times10^6$ *Sf*9 细胞，每孔中加入 2ml 无血清昆虫细胞培养液。

    使用成活率大于 97%处于对数生长期的细胞（$1\times10^6$～$2\times10^6$ 个）。

25. 28℃培养细胞 1h，使其贴壁。
26. 转染试剂的准备
    a. 用昆虫细胞培养液稀释 5μl 杆粒（步骤 23），终体积为 100μl。
    b. 用昆虫细胞培养液稀释 6μl Cellfectin 转染试剂，终体积为 100μl。
    c. 混合杆粒 DNA 和 Cellfectin，轻轻混匀，室温孵育 20～45min。
    d. 加入 0.8ml 昆虫细胞培养液到装有脂质体-DNA 复合物的管子中，轻轻混匀。
27. 吸去培养板中的培养液，用 1ml 脂质体-DNA 复合物/孔覆盖细胞，28℃培养 5h。
28. 吸去转染试剂，加入 2ml/孔昆虫细胞培养液。28℃培养 3～4d。
29. 将培养上清转到一个无菌有盖的管子中。500$g$ 离心 5min 沉淀细胞碎片。将有病毒的上清转移到新的管中。

    原代储备病毒在避光条件下可以在 4℃存放 6 个月以上，在－70℃则可以存放更长的时间。为了获得病毒最长的保存时间，可以在原代储备病毒中加入终浓度为 2%的胎牛血清。

30. 用噬斑形成法或终点稀释法来测定病毒滴度（O'Reilly et al. 1994）。

## 二代储备病毒的产生

31. 用 moi 为 0.01～0.1 的原代储备病毒感染悬浮培养的 *Sf*9 细胞（$1\times10^6$ 个/ml，对数生长期）。

    在这一步中使用低 moi 的病毒去避免有缺陷的干扰颗粒的积累是很重要的。通常的，60μl 原代病毒储备液可以制备 30ml 的二代储备病毒。

32. 28℃培养细胞 4d。
33. 1000$g$ 离心 5min，将上清转移到一个新的管子中，4℃避光保存。
34. 确定二代储备病毒的滴度。

    乐观的估计二代储备病毒的滴度≥$10^8$ pfu/ml。

## 大规模的病毒和蛋白质的生产

35. 用 moi 为 0.01～0.1（步骤 36）或 5.0（步骤 37）的二代储备病毒感染所需体积的

昆虫细胞（1×10⁶ 个/ml）。28 ℃培养细胞 3～4d。下接步骤 36 或 37。

36. 制备用作转基因实验的病毒。
    a. 培养物 5000 *g* 离心 20min。
    b. 将含有病毒的上清移到一无菌管中。浓缩病毒（Airenne et al. 2000；Haeseleer et al. 2001）。
    c. 测定病毒滴度。
37. 重组蛋白质的生产。
    a. 1000 *g* 离心细胞 20min。
    b. 从培养液或细胞中纯化表达的重组蛋白质，需要根据重组蛋白质的性质来加以确定。

       在重组蛋白质上加入合适的亲和标签可以大大简化纯化的工作（Arnau et al. 2006）。

# 方案 2

## 重组杆状病毒转导脊椎动物细胞

### 材料

**注意**：标有 <!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

杆状病毒（浓缩的高滴度的储备病毒）
细胞（如人肝细胞系；HepG2），指数生长期细胞
细胞培养液（完全培养液，无血清培养液和选择培养液）
Dulbecco 磷酸盐缓冲液（PBS）
    2.7mmol/L KCl <!>
    1.5mmol/L $KH_2PO_4$ <!>
    136.9mmol/L NaCl
    8.9mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
丁酸钠（1mol/L，溶于 PBS）（Sigma-Aldrich）
    0.2μm 滤器过滤除菌
胰蛋白酶-EDTA（Cambrex）<!>

#### 仪器

细胞培养管
离心管（15ml）
移液管（10ml）
组织培养板（6 孔板）

## 方法

这个方法是基于6孔板培养的细胞上设计的，如果使用的是与6孔板直径不同的多孔板或培养皿，需要相应地调整细胞的密度和试剂的体积。

### 收取处于指数生长期的细胞

1. 除去细胞培养液，用5～10ml无菌的PBS润洗细胞一次。
2. 用胰蛋白酶-EDTA消化细胞，每90mm培养皿大约用1ml。
3. 将细胞悬液移到一个装有4ml新鲜培养液的15ml离心管子中，室温47～92*g*离心5～7min。
4. 除去培养液，用1～4ml新鲜培养液重悬细胞沉淀。
5. 用血球计数板确定细胞密度，将细胞稀释到$1\times10^5$～$2\times10^5$后接种于6孔板中。
6. 每孔加入3ml培养液，将细胞置于加湿的培养箱中培养18～20h，5%$CO_2$，37℃。

   准确的细胞密度由细胞的大小和生长率决定，并且需要通过实验来确定。细胞在转导时达到50%～70%的汇合度可以获得好的转导效率。

### 转导

7. 用预热的含有病毒的无血清培养液替换原先的培养液，将细胞和病毒在加湿的培养箱中孵育2h，5%$CO_2$。

   温和的操作杆状病毒。病毒不能经受剧烈涡旋或反复吹打。

8. 吸去含有病毒的培养液，每孔中加入3ml预热的含血清的培养液。继续培养细胞。
9. 转导后24～72h，检查细胞。

## 疑难解答

很多可供选择的培养条件可用于提高杆状病毒转导脊椎动物细胞的效率。相比用PBS溶解的浓缩病毒stock（来自方案1，第36步），第二代高滴度病毒stock（方案1，第34步）可以至少1∶1稀释到培养液（Cheng et al. 2004）。在培养时每隔60min轻轻振荡培养板确保细胞和病毒能充分接触（第7步）。延长转导时间和降低转导温度（如降至25℃），再使用适合的转导培养液可以改善转导的效果（Hsu et al. 2004）。将病毒一直和细胞共同孵育直到试验前同样也可以改善转导效率。在培养液中加入微管解聚剂（Salminen et al. 2005 ）或加入终浓度为2.4～5mmol/L的丁酸钠（Condreay et al. 1999；Airenne et al. 2000）在杆状病毒介导的基因递送中的作用还存在争议。最后，由于杆状病毒的细胞毒性较低，细胞可以重复转化若干次（Hu et al. 2003）。

还可以在构建病毒载体时通过改造病毒来提高转导效率。重组杆状病毒如果含有疱疹口炎病毒糖蛋白（VSV-GED）或其他包装的改造都能够增加转导效率（Barsoum et al. 1997；Ojala et al. 2001；Oker-Blom et al. 2003；Tani et al. 2003；Raty et al.

2004；Kitagawa et al. 2005；Kaikkonen et al. 2006）。选择不同的启动子也会造成转导效率的不同。鸡 β-actin 启动子在某些细胞中比细胞巨化病毒具有更好的促进转基因表达的能力（Shoji et al. 1997；Spenger et al. 2004）。用具有组织特异性的启动子可以获得细胞类型特异性的基因表达（Shoji et al. 1997；Spenger et al. 2004）。

## 参考文献


Airenne K.J., Mahonen A.J., Laitinen O.H., and Yla-Herttuala S. 2004. Baculovirus-mediated gene transfer: An evolving new concept. In *Gene and cell therapy*, 2nd edition (ed. N.S. Templeton), pp. 181–197. Marcel Dekker, New York.

Airenne K.J., Hiltunen M.O., Turunen M.P., Turunen A.M., Laitinen O.H., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2000. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* **7:** 1499–1504.

Aoki H., Sakoda Y., Jukuroki K., Takada A., Kida H., and Fukusho A. 1999. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet. Microbiol.* **68:** 197–207.

Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., and Pedersen J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48:** 1–13.

Ayres M.D., Howard S.C., Kuzio J., Lopez-Ferber M., and Possee R.D. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202:** 586–605.

Barsoum J., Brown R., McKee M., and Boyce F.M. 1997. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2011–2018.

Blissard G.W. and Wenz J.R. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* **66:** 6829–6835.

Boublik Y., Di Bonito P., and Jones I.M. 1995. Eukaryotic virus display: Engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology* **13:** 1079–1084.

Burgess S. 1977. Molecular weights of lepidopteran baculoviruses DNAs: Derivation by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* **37:** 501–510.

Cheng T., Xu C.Y., Wang Y.B., Chen M., Wu T., Zhang J., and Xia N.S. 2004. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J. Gastroenterol.* **10:** 1612–1618.

Condreay J.P., Witherspoon S.M., Clay W.C., and Kost T.A. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 127–132.

Davies A.H. 1994. Current methods for manipulating baculoviruses. *Biotechnology* **12:** 47–50.

Duisit G., Saleun S., Douthe S., Barsoum J., Chadeuf G., and Moullier P. 1999. Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J. Gene Med.* **1:** 93–102.

Fraser M.J. 1986. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95:** 189–195.

Ghosh S., Parvez M.K., Banerjee K., Sarin S.K., and Hasnain S.E. 2002. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. *Mol. Ther.* **6:** 5–11.

Gröner A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In *The biology of baculoviruses* (ed. R.R. Granados and B.A. Federici), vol. 1, pp. 177–202. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Haeseleer F., Imanishi Y., Saperstein D.A., and Palczewski K. 2001. Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42:** 3294–3300.

Harrap K.A. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology* **50:** 124–132.

Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., and Strauss M. 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 10099–10103.

Hsu C.S., Ho Y.C., Wang K.C., and Hu Y.C. 2004. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **88:** 42–51.

Hu Y.C. 2005. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **26:** 405–416.

Hu Y.C., Tsai C.T., Chang Y.J., and Huang J.H. 2003. Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnol. Prog.* **19:** 373–379.

Hynes R.O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69:** 11–25.

Jones I. and Morikawa Y. 1996. Baculovirus vectors for expression in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7:** 512–516.

Kaikkonen M.U., Raty J.K., Airenne K.J., Wirth T., Heikura T., and Yla-Herttuala S. 2006. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **13:** 304–312.

Kidd I.M. and Emery V.C. 1993. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42:** 137–159.

Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. 2005. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* **79:** 3639–3652.

Kost T.A., Condreay J.P., and Jarvis D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **23:** 567–575.

Laitinen O.H., Airenne K.J., Hytonen V.P., Peltomaa E., Mahonen A.J., Wirth T., Lind M.M., Makela K.A., Toivanen P.I., Schenkwein D., Heikura T., Nordlund H.R., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2005. A multipurpose vector system for the screening of libraries in bacteria, insect and mammalian cells and expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* **33:** e42.

Lehtolainen P., Tyynela K., Kannasto J., Airenne K.J., and Yla-Herttuala S. 2002. Baculoviruses exhibit restricted cell type specificity in rat brain: A comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intracerebral gene transfer in vivo. *Gene Ther.* **9:** 1693–1699.

Leisy D.J., Lewis T.D., Leong J.A., and Rohrmann G.F. 2003. Transduction of cultured fish cells with recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* **84:** 1173–1178.

Leusch M.S., Lee S.C., and Olins P.O. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene* **160:** 191–194.

Li Y., Yang Y., and Wang S. 2005. Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter. *Exp. Physiol* **90:** 39–44.

Li Y., Wang X., Guo H., and Wang S. 2004. Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. *Mol. Ther.* **10:** 1121–1129.

Luckow V.A., Lee S.C., Barry G.F., and Olins P.O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67:** 4566–4579.

McCormick C.J., Challinor L., Macdonald A., Rowlands D.J., and Harris M. 2004. Introduction of replication-competent hepatitis C virus transcripts using a tetracycline-regulable baculovirus delivery system. *J. Gen. Virol.* **85:** 429–439.

Miller L.K. 1993. Baculoviruses: High-level expression in insect cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3:** 97–101.

Ojala K., Mottershead D.G., Suokko A., and Oker-Blom C. 2001.

Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284:** 777–784.

Oker-Blom C., Airenne K.J., and Grabherr R. 2003. Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **2:** 244–253.

Oomens A.G. and Blissard G.W. 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **254:** 297–314.

O'Reilly D.R., Miller L.K., Luckow V.A. 1994. *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual.* Oxford University Press, New York.

Park S.W., Lee H.K., Kim T.G., Yoon S.K., and Paik S.Y. 2001. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289:** 444–450.

Pieroni L., Maione D., and La Monica N. 2001. In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **12:** 871–881.

Raty J.K., Airenne K.J., Marttila A.T., Marjomaki V., Hytonen V.P., Lehtolainen P., Laitinen O.H., Mahonen A.J., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2004. Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol. Ther.* **9:** 282–291.

Salminen M., Airenne K.J., Rinnankoski R., Reimari J., Valilehto O., Rinne J., Suikkanen S., Kukkonen S., Yla-Herttuala S., Kulomaa M.S., and Vihinen-Ranta M. 2005. Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes. *J. Virol.* **79:** 2720–2728.

Sandig V., Hofmann C., Steinert S., Jennings G., Schlag P., and Strauss M. 1996. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **7:** 1937–1945.

Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., and Matsuura Y. 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* **78:** 2657–2664.

Smith G.E., Summers M.D., and Fraser M.J. 1983. Production of human beta interferon in insect cells with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3:** 2156–2165.

Song S.U., Shin S.H., Kim S.K., Choi G.S., Kim W.C., Lee M.H., Kim S.J., Kim I.H., Choi M.S., Hong Y.J., and Lee K.H. 2003. Effective transduction of osteogenic sarcoma cells by a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.* **84:** 697–703.

Spenger A., Ernst W., Condreay J.P., Kost T.A., and Grabherr R. 2004. Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein Expr. Purif.* **38:** 17–23.

Summers M.D. and Anderson D.L. 1972. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: A closed, double-stranded molecule. *J. Virol.* **9:** 710–713.

Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. 2001. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* **279:** 343–353.

Tani H., Limn C.K., Yap C.C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., and Matsuura Y. 2003. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77:** 9799–9808.

Vaughn J.L., Goodwin R.H., Tompkins G.J., and McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13:** 213–217.

Wang P., Hammer D.A., and Granados R.R. 1997. Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. *J. Gen. Virol.* **78:** 3081–3089.

# 第二十八章　α-病毒：作为基因转移载体的西门里克森林病毒和辛德毕斯病毒

Kenneth Lundstrom

Flamel Technologies，33 Avenue du Dr. Georges Lévy，69693 Vénissieux，France

华中和吕青　译



## 摘要

α-病毒西门里克森林病毒（semliki forest virus，SFV）和辛德毕斯病毒（sindbis virus，SIN）经常被用来作为体外和体内的表达载体。在大多数情况下，这些系统由需要一个辅助载体来包装重组颗粒的复制缺陷型载体组成。最近，已经研发出能大量复制的载体。可以用不同的方式来使用α病毒载体，如核酸载体（DNA和RNA）或感染性

颗粒等。通常高滴度的病毒产物在两天内即可产生，并且不需要进一步浓缩和纯化。α病毒载体广谱的宿主范围使其能在哺乳动物及非哺乳动物细胞系、原代细胞培养物及体内的研究中使用。α病毒强烈的嗜神经元特性，使其在神经生物学研究中特别有用。但不幸的是，α病毒对宿主细胞强烈的细胞毒性作用、相对短期的瞬时表达模式以及相当高的病毒产物消耗，都是其缺点。然而，新的突变α病毒显示出了低毒性及长期表达的优点。尤其是高产量的膜蛋白（通常在重组系统中很难有较高水平的表达）有益于在结构生物学上的应用。α病毒也可以用于疫苗开发和基因治疗。

## 引言

α病毒（Togaviridae）对人有不同程度的致病性。SFV、SIN 和委内瑞拉马脑炎（venezuelan equine encephalitis，VEE）都已被发展成为表达载体（图 1，见彩版）。复制缺陷型表达载体含有α病毒非结构蛋白基因（nsPs）和目的基因（图 1B），而结构蛋白则由一个辅助载体提供，以便产生有复制缺陷的病毒颗粒。这个复制复合体（nsP1-4 蛋白）在每个细胞内可产生大约 200 000 个 RNA 拷贝，并且亚基因组 26S 启动子可驱动异源基因的表达。对辅助载体的修饰可使产生的 SFV 颗粒在一定的条件下才具备感染性。可以通过分离辅助系统获得进一步的安全性改进，这降低了同源重组的可能性。与此相反，可自主复制的载体含有全长的基因组（图 1C），该载体可提供持续的感染同时产生后代病毒。在这些载体中，在结构蛋白基因的下游引入了一个亚基因组的启动子

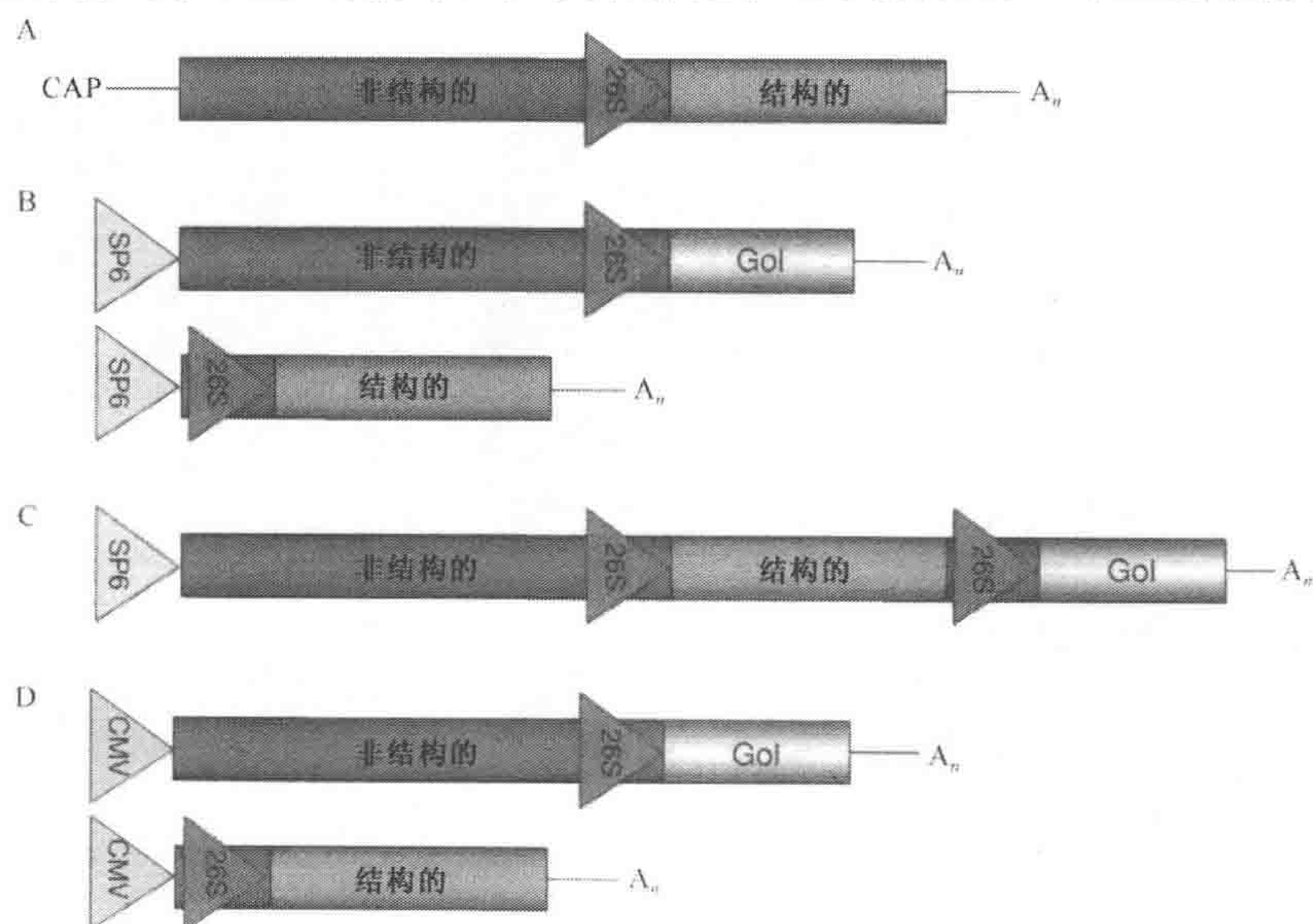



图 1. α病毒表达系统图示。A. α病毒的全长基因组。B. 复制缺陷型系统的表达载体（上）和辅助载体（下）。C. 可自主复制的载体。D. 基于 DNA 的系统的表达载体（上）和辅助载体（下）。(GoI) 目的基因；(CMV) 巨细胞病毒启动子；(SP6) SP6 RNA 聚合酶启动子；(26S) α病毒亚基因组启动子。

来驱使插入外源基因的表达。例如，非致病性形式的自主复制 A7（74）病毒株能有效地转导椎体细胞、中间神经元和海马趾切片培养物中的神经胶质细胞，并且在腹膜内注射后中央神经元系统中可表达绿色荧光蛋白（GFP）。最后，在 SFV 和 SIN 载体中用一个真核聚合酶 II 类型的启动子取代 SP6 RNA 聚合酶启动子即可构建基于 DNA 的质粒载体（图 1D），使之没有与感染性病毒偶联的危险。与基于 DNA 的辅助载体共转染可以使 DNA 载体产生病毒产物。

α病毒在分子生物学、神经科学、药物开发、结构生物学、疫苗研制和基因治疗等方面都有广泛的应用。在大量的结构定性研究中已经使用 SFV 载体制备了很多 G 蛋白偶联受体（GPCR）和配体门离子通道。在 11.5L 生物反应器里面即可生产 2～5μg/ml 鼠血清素 5-HT$_3$ 受体，纯化后的血清素具有高同源性，并且可以通过圆形二色性和单颗粒成像来确定其结构特征。在旋转培养瓶中培养的 CHO 细胞可以表达 10μg/ml 的人 NK1 受体，并且纯化的受体可形成其最初的二维晶体。最近，对 GPCR 的研究显示，大量的受体可以在结构生物学允许的水平上表达。

广谱的宿主细胞范围容许使用α病毒载体在多种不同类型细胞系和原代细胞中进行基因转移和表达的研究（图 2，见彩版，表 1），尤其是神经元和海马趾切片培养物。将 SIN 和 SFV 趋实物性注射进入啮齿动物大脑后发现，β-半乳糖苷酶分别在小鼠尾壳核和伏隔核及大鼠扁桃体和纹状体中都有局部和瞬时表达。以不同的形式（重组颗粒、裸 RNA 和 DNA 质粒）用 SFV、SIN 和 VEE 载体开发疫苗可产生对致死流感的抵抗保护。另外，用肿瘤抗原在动物模型上进行免疫结果显示出治疗和预防效力。

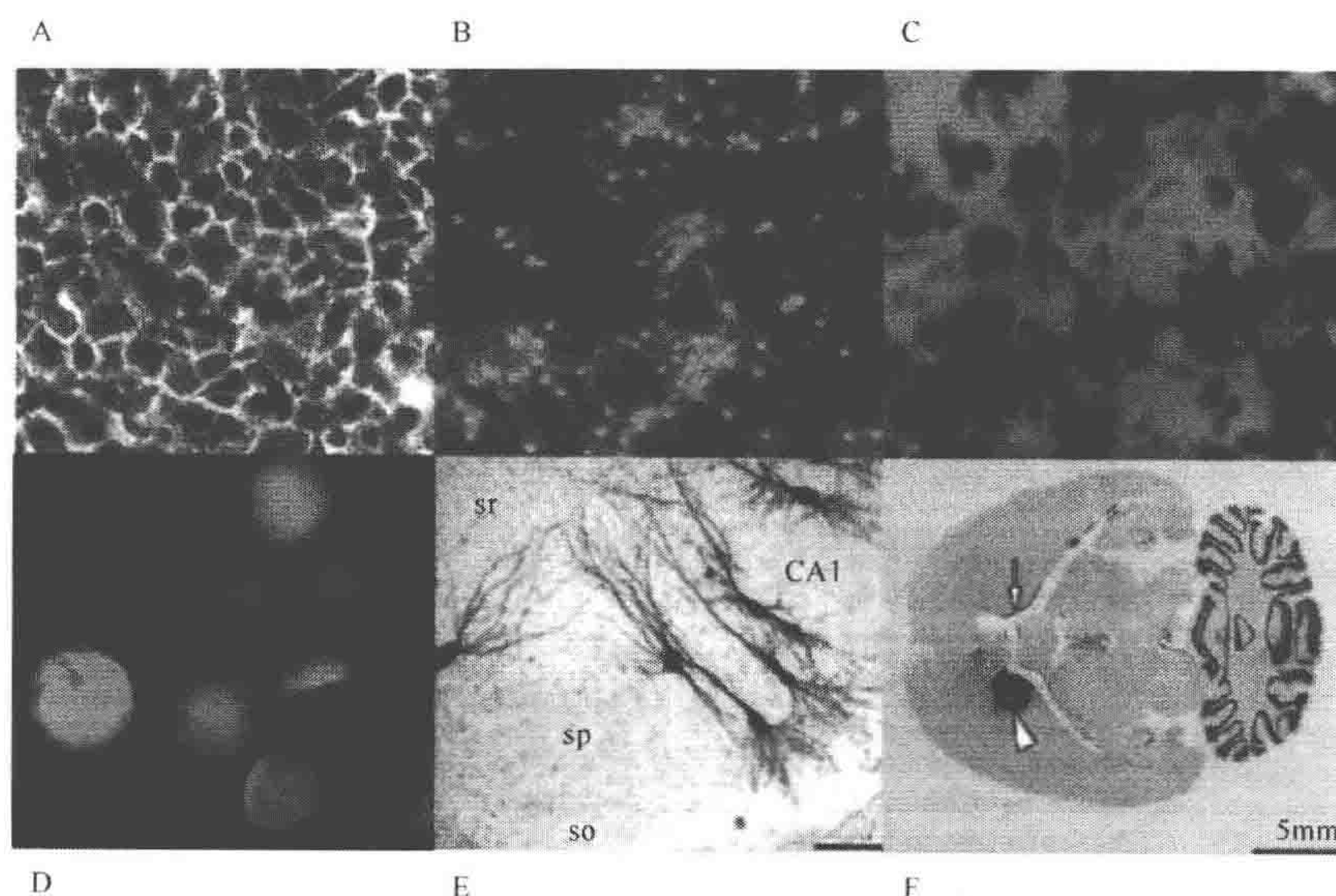



图 2. 宿主范围和 SFV 载体表达图案示例。A. 感染了 SFV-*lacZ* 的 BHK-21 细胞。B. 感染了 SFV-GFP 的大鼠原代海马趾神经元细胞。C. 感染了 SFV-*lacZ* 的人前列腺 DU-145 细胞。D. 感染了 SFV-PD-GFP 的 *Xenopus* 卵母细胞。E. 感染了 SFV-*lacZ* 的大鼠海马趾切片培养物。F. 大鼠脑内的 SFV-*lacZ* 定向微注射（注射 1d 后）。

**表 1. α 病毒载体的宿主细胞范围**

| 细胞类型 | 转导率 | 参考文献 |
|---|---|---|
| **哺乳动物细胞系** | | |
| 腺泡细胞 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 人前列腺肿瘤细胞 ALVA-31 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| 幼仓鼠肾细胞 BHK-21 | 高 | Liljeström and Garoff 1991 |
| 中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 | 高 | Lundstrom et al. 1994 |
| 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| 绿猴肾细胞 COS M6 | 高 | Blasey et al. 1998 |
| 绿猴肾细胞 COS-7 | 高 | Liljeström and Garoff 1991 |
| 人 T 淋巴细胞 C8166 | 高 | Hassaine et al. 2005 |
| 人前列腺肿瘤细胞 DU-145 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| 人上皮肿瘤细胞 HeLa | 中等 | Liljeström and Garoff 1991 |
| 人肥大细胞 HMC-1 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 人骨肉瘤细胞 HOS | 高 | Liljeström and Garoff 1991 |
| 杂交瘤 179 | 中等 | Blasey et al. 1998 |
| 人前列腺肿瘤细胞 JCA-1 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| Jurkat | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 人类嗜碱细胞 KU812 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 人前列腺肿瘤细胞 LnCAP | 高 | Hardy et al. 2000 |
| 小鼠腹膜肥大细胞 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 犬肾细胞 MDCK | 中等 | Olkkonen et al. 1993 |
| 小鼠乳腺上皮细胞 MME | 高 | Olkkonen et al. 1993 |
| 成淋巴细胞白血病 MOLT-4 细胞 | 低 | Paul et al. 1993 |
| 小鼠成神经细胞瘤 NIE 115 细胞 | 中等 | Blasey et al. 1998 |
| 小鼠嗅觉上皮 OLF442 细胞 | 高 | Monastyrskaia et al. 1999 |
| 人前列腺肿瘤 PC-3 细胞 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| PC12 | 中等 | K. Lundstrom 未发表 |
| 人前列腺肿瘤 PRC-1 细胞 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| 人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞 | 中等 | Blasey et al. 1998 |
| 肾脏 RIN 细胞 | 高 | Lundstrom et al. 1997 |
| 人骨髓瘤 RPMI 8226 细胞 | 低 | Blasey et al. 1998 |
| 瑞士 3T3 细胞 | 低 | Arudchandran et al. 1999 |
| 人成淋巴 TK6 细胞 | 高 | Blasey et al. 1998 |
| 人前列腺肿瘤 TSU-PR1 细胞 | 中等 | Hardy et al. 2000 |
| 仓鼠肺成纤维 V79 细胞 | 高 | Frosman et al. 2000 |
| 人肺成纤维 WI-26 VA4 细胞 | 高 | Frosman et al. 2000 |
| **非哺乳动物细胞** | | |
| 鸡胚胎成纤维 CEF 细胞 | 高 | Xiong et al. 1989 |
| 鲑鱼 CHSE-214 细胞 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| *Aedes aegypti* 昆虫 C6/36 细胞 | 高 | Olson et al. 1994 |
| 蝗虫胚胎 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| *Aedes aegypti* 昆虫 MOS-20 细胞 | 高 | Pettigrew and O,Neill 1999 |
| *Drosophila melanogaster* 昆虫 SL3 细胞 | 中等 | K. Lundstrom 未发表 |

续表

| 细胞类型 | 转导率 | 参考文献 |
| --- | --- | --- |
| **非哺乳动物细胞** | | |
| *Xenopus* 卵母细胞 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| **原代细胞** | | |
| 牛内皮 BAEC 细胞 | 低[a] | K. Lundstrom 未发表 |
| 背脊神经节 DRG 细胞 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| 人原代成纤维 HPF 细胞 | 高 | Huckriede et al. 1996 |
| 大鼠肌管细胞 | 高 | K. Lundstrom 未发表 |
| NK 细胞 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 大鼠神经元 NT2N 细胞 | 高 | Cook et al. 1996 |
| 大鼠原代脑皮层神经元 PCN 细胞 | 高 | Olkkonen et al. 1993 |
| 前列腺上皮管切片细胞 | 高 | Hardy et al. 2000 |
| 柱状 RBL-2H3 细胞 | 低[a] | Arudchandran et al. 1999 |
| 大鼠海马趾神经元 RHN 细胞 | 高 | Olkkonen et al. 1999 |
| 大鼠海马趾切片培养细胞 | 高 | Ehrengruber et al. 1999 |
| 子宫颈上神经节 SCG 细胞 | 高 | Ulmanen et al. 1997 |

a. 需要聚乙二醇。

α 病毒载体也被应用于肿瘤的治疗。将 SFV-*lacZ* 颗粒高效转导很多人的前列腺肿瘤细胞系可导致 β-半乳糖苷酶高水平表达及 SFV 诱导的细胞凋亡。小鼠皮下 H358a 肿瘤的种植可导致肿瘤消退。在另一个研究中，B16 肿瘤模型可以评估含有治疗性白细胞介素 12 亚单位 p40 和 p35 的 SFV 载体，已有研究显示该治疗方法可引起显著的肿瘤消退和抑制肿瘤血管形成。另外，在 BALB/c 小鼠的异种移植的 K-BALB 和 CT26 的肿瘤内注射重组的 SFV-IL-12 颗粒可导致肿瘤完全消退。最近的动物模型研究结果显示，全身给药的 SIN-IL-12 颗粒载体可以自然地攻击肿瘤。另外，在一个胰腺肿瘤模型和一组肾肿瘤和黑色素瘤患者体内进行的临床 I 期有限试验中，脂质体包裹的 SFV 颗粒显示出肿瘤靶向性，同时可以防止宿主免疫识别。

对宿主细胞的内在细胞毒性限制了 α 病毒的应用范围。然而，已开发了数个 SFV 和 SIN 的突变载体降低了细胞毒性。SFV nsP2 基因内的两点突变产生了一个转基因高表达的载体，该载体对宿主细胞的蛋白质合成影响相对较小，同时可有效地延长宿主细胞的存活。很多 α 病毒突变载体对温度敏感，这些载体可应用于允许温度下的表达研究。

## 方案 1

# 重组 α 病毒载体的制备

基于 SFV 和 SIN 的表达系统将两个载体应用于重组颗粒的制备。根据常规步骤将目的基因亚克隆进入 SFV 和 SIN 表达载体的多克隆位点（图 3）。然而，由于 α 病毒载体较大，因此更明智的是将 PCR 产物先克隆进其他类型的克隆载体，如 pCR4Blunt-TOPO 载体。重组质粒内插入片段的存在及其插入方向可以用限制性内切核酸酶消化

来鉴定，同时建议用中提或大提制备质粒 DNA，使之用于下游步骤。小提制备的 DNA 可以用于体外转录和成功的病毒复制，尽管 DNA 质量在高滴度重组 α 病毒颗粒的制备过程中有着至关重要的作用。除了如下描述的基于 RNA 的载体，还可以将含有 CMV 或其他 RNA 聚合酶 II 启动子的 DNA 载体用于质粒 DNA 的直接转染。基于 SFV 的 pSCA 表达载体和 pSCA 辅助载体的共转染可以制备重组病毒颗粒。

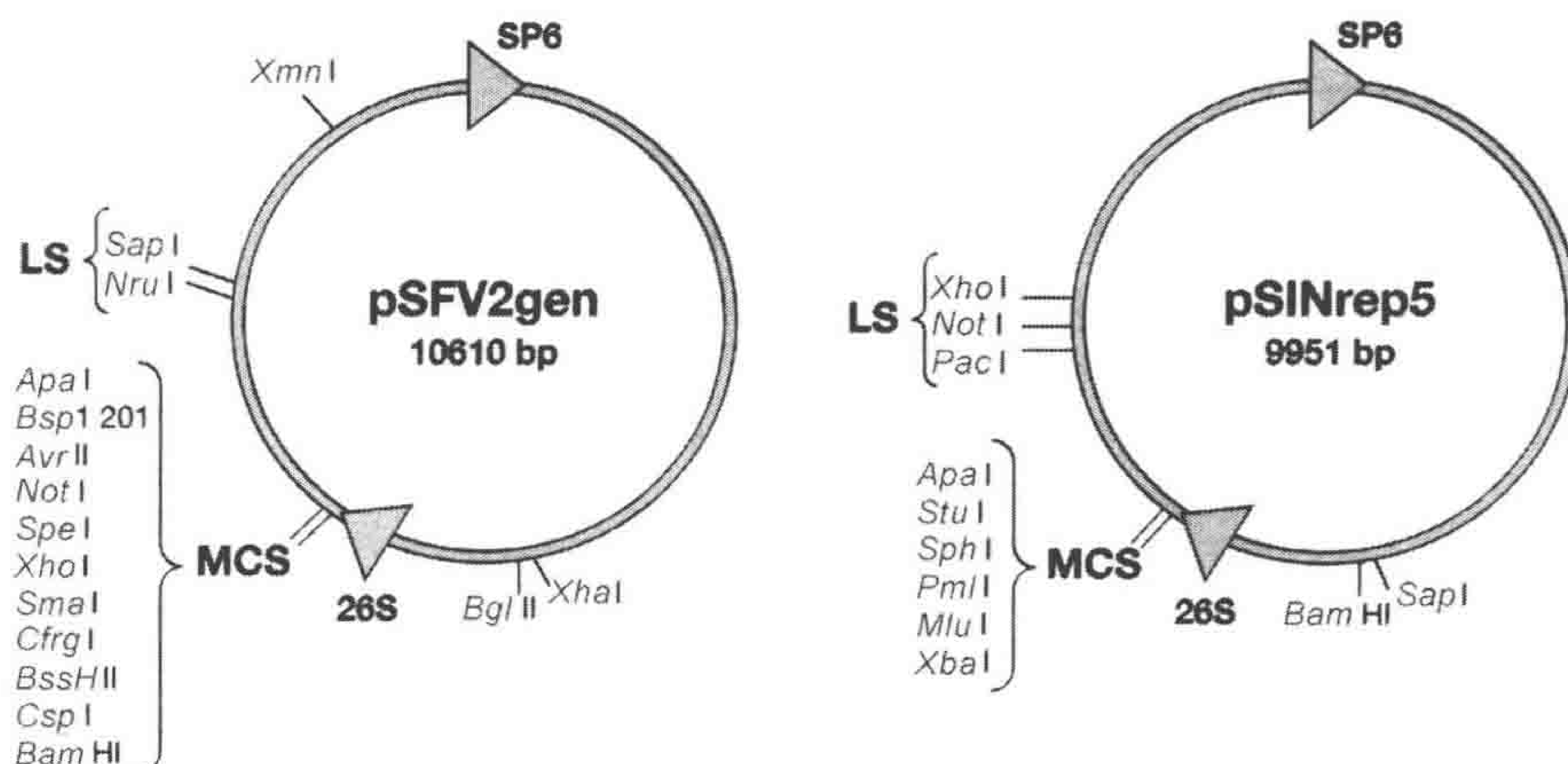



图 3. SFV 和 SIN 表达载体的质粒图谱。A. 带有如图所示的 MCS（多克隆位点）和 LS（线性化位点）区域的 pSFV2gen 和 pSINrep5。由于 MCS 和 LS 之间的区域中含有 RNA 复制起点和多聚腺苷酸信号，LS 不能用作克隆位点。在位点 9929 上的唯一的 *Xmn*I 位点也不能用作克隆位点，因为 RNA 转录体太长，以至于无法正常发挥功能。唯一的限制酶酶切位点 *Bgl*II 和 *Xba*I（pSFV2gen）和 *Bam*HI 和 *Sap*I（pSINrep5）可用来确定插入的方向。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖

Aprotinin（10mg/ml）

仓鼠幼鼠的肾细胞（BHK-21）

使用 BHK-21 黏附细胞培养物制备重组 SFV 和 SIN 颗粒，用 BHK-21 悬浮细胞大量制备蛋白质产物。中国仓鼠卵巢细胞（CHO-K1）和人胚胎肾细胞（HEK293）可用于表达研究。

帽类似物（$m^7G$［5′］ppp［5′］G）

α-胰凝乳蛋白酶，20mg/ml

完全 BHK 培养基

将 Dulbecco's modified F-12 培养基和 Iscove's modified 培养基 1∶1 混合后，加上 4mmol/L 谷氨酸盐和 10%胎牛血清（FCS）。

DTT，50mmol/L

DMRIE-C（Invitrogen）

乙醇（70%和 95%，*V*/*V*）

Opti-MEM I 低血清培养基

苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1，*V*/*V*/*V*）<!>

质粒

- pSINRep5（Invitrogen）
- pSINrep504
- SIN 辅助载体 DH-BB
- SIN 辅助载体 DH-BB（26S）5′SIN（Invitrogen）

  所有 SIN 和 SIN 辅助载体都需经过 *Xho*I 酶切线性化。
- pSFV1（*Spe*I 线性化）
- pSFV2gen（*Nru*I 线性化）
- pSFV-helper2 载体
- pSFV-helperS2
- pSFV-helperCS219A

将所有 SFV 载体用 *Spe* I 线性化。

PBS

限制性内切核酸酶：*Not* I、*Nru* I、*Pac* I、*Sap* I、*Spe* I、*Xho* I

RNA 酶抑制物（10～50U/μl）

rNTP 混合物

- 10mmol/L rATP
- 10mmol/L rCTP
- 10mmol/L rUTP
- 5mmol/L rGTP

10× SP6 缓冲液

- 400mmol/L HEPES（pH 7.4）
- 60mmol/L 乙酸镁
- 20mmol/L 亚精胺

15×SP6 缓冲液

SP6 RNA 聚合酶（10～20U/μl）

胰酶-EDTA

- 0.25%胰酶<!>
- 1mmol/L EDTA

无 RNA 酶水

## 仪器

细胞培养板（6 孔、12 孔和 24 孔）

电穿孔管（0.2cm 和 0.4cm）

电穿孔仪（BioRad Gene Pulser）

设置如表2，如果使用其他的电穿孔仪，请咨询相关厂商。

Falcon 管（15cm 和 50 ml）

滤器（无菌，0.22μm，微孔）

凝胶电泳仪

加热器

孵箱，37℃，5% $CO_2$

微离心机

微离心管

注射器（无菌，1ml、10ml 和 50ml）

组织培养瓶（T25、T75 和 T175）

水池

**表 2. BioRad Gene Pulser 电穿孔仪设置**

| | 0.2cm 电穿孔管 | 0.4cm 电穿孔管 |
|---|---|---|
| 电容放大器 | 960μF | 960μF |
| 电压 | 1500V | 850V |
| 电容器 | 25μF | 25μF |
| 电阻(电流控制器) | αΩ | 阻断的 |
| 预期的持续时间 | 0.8s | 0.4s |

## 方法

### DNA 线性化

1. 至少需要线性化 5～10μg 质粒 DNA（更大量的可以保存于－20℃）。
2. 用苯酚：氯仿提取物纯化线性化的 DNA，然后乙醇－20℃沉淀过夜或－80℃，15min。
3. 4℃，18 000*g* 离心乙醇沉淀物 15min。
4. 用 70%乙醇洗涤，重复离心 5min。
5. 空气中晾干或冻干 DNA 沉淀。
6. 重悬沉淀物于无 RNA 酶水中，使终浓度为 0.5μg/μl。

   用琼脂糖凝胶电泳确认是否完全消化。

### 体外转录

对于获得高滴度的病毒产物，体外转录过程是非常重要的。建议将新鲜制备的 RNA 样品用于电穿孔，尽管 RNA 转录本可在－80℃保存数周。在这些情况下，每个转录反应可以制备 20～50μg 的 RNA。如果需要大量的病毒，通过放大如下步骤中的反应体积可以获得大量的病毒。

7. 室温下在 1.5ml 离心管中为表达和辅助载体准备单独的反应混合物（表 3），最后

加酶。

**表 3. SFV 和 SIN 体外转录反应混合物**

| | SFV/μl | SIN/μl |
|---|---|---|
| 线性化质粒(2.5μg) | 5 | 5 |
| 10×SP6 缓冲液 | 5 | — |
| 15×SP6 缓冲液 | — | 10 |
| 10mmol/L 帽类似物 | 5 | 5 |
| 50mmol/L DTT | 5 | 5 |
| rNTP 混合物 | 5 | 5 |
| 无 RNA 酶水 | 20 | 15 |
| RNA 酶抑制剂 | 1.5 | 1.5 |
| SP6 RNA 聚合酶 | 3.5 | 3.5 |

8. 混合所有的反应组分，并稍微离心一下。
9. 37℃孵育 1h（SFV）或 40℃孵育 1h（SIN）。
10. 取 1～4μl 样品 0.8%琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 分析。

    高质量的 RNA 可以产生相对厚的带而不会弥散。单链 RNA 的大小不能直接于 DNA 分子质量标准相比，因为单链 RNA 迁移比 DNA 快 4 倍。然而，表达载体产生的 RNA 大约 8kb（根据插入片段的大小而略有不同），辅助 RNA 迁移得更快。

11. 立即转染高质量的 RNA 或保存于－80℃。

## RNA 转染

12. 通过电穿孔或者脂质体介导的转染将新鲜制备的或刚刚融化的 RNA 转染进细胞。

    如果使用刚刚融化的 RNA，使用前通过凝胶电泳来重新鉴定 RNA 的质量。

    **RNA 的电穿孔转染**

    一般说来，BHK-21 细胞比较适合用于电穿孔。细胞不得传代超过 3 个月，因为传代超过 3 个月的细胞将逐渐丧失活力。电穿孔前，细胞种板不得超过 48h，并且其汇合度不得超过 80%。

    a. 将足量的 BHK-21 细胞种至 T175 细胞瓶（1∶3 过夜或 1∶5 隔两夜）。

       转染前注意细胞的生长和形态。

    b. 用 PBS 洗涤细胞一次，每个 T175 细胞培养瓶加入 6ml 胰酶-EDTA，37℃孵育 5min。

    c. 重悬细胞使细胞聚集块破开。加入细胞培养基至 25ml，800*g* 离心 5min。

    d. 用少量的 PBS 重悬细胞沉淀（少于 5ml）。加 PBS 至 25ml 并 800*g* 离心 5min。

    e. 每个 T175 细胞培养瓶用 2.5ml PBS 重悬细胞沉淀（相当于 $1\times10^7$～$2\times10^7$ 个细胞/ml）。

       将细胞立即使用于电穿孔，可以短暂的将细胞置于冰上保存（短于 1h）。

    f. 将细胞悬浮物转移至电穿孔管（0.2cm 管中可放 0.4ml，0.4cm 管则可放 0.8ml）。

    g. 将 20～45μl 重组 DNA 和 20μl 辅助 RNA（按如上步骤 7～11 制备）加入细胞悬

浮物中。

h. 将电穿孔管放在电穿孔仪架上，然后设置两个电极。

i. 用细胞培养基 25 倍稀释细胞。将细胞转移至细胞培养瓶或板内。

j. 在含 5% $CO_2$ 的孵箱中将细胞 37℃孵育过夜。

当使用温度敏感型突变 α 病毒载体时，将孵育温度降至 30℃或 33℃。

k. 按如下步骤 13～16 收集重组病毒颗粒。

**脂质体介导的 RNA 转染**

作为电穿孔的替代方法，RNA 可以通过脂质体试剂来转染细胞。

a. 用 2ml 培养基将 $1.5\times10^5$～$3\times10^5$ 个 BHK-21 细胞种至 35mm 盘或 6 孔细胞板。

培养细胞至汇合度 80%左右。

b. 用 2ml Opti-MEM I Reduced-Serum 培养基清洗细胞。

c. 在每个 1.5ml 离心管（一共 6 个），加入 1ml 室温的 Opti-MEM I Reduced-Serum 培养基。

d. 在 6 个 1.5ml 离心管中依次加入 0、3、6、9、12 或 15μl DMRIE-C，轻轻的振荡一下。

e. 在一个单独的管子中，将 60μl（约 30μg）体外转录的重组 RNA 和 30μl（约 12.5μg）辅助 RNA 混合。

f. 在 6 个含有转染混合物的离心管中分别加入 15μl RNA 混合物，轻轻的振荡一下。

g. 将脂质体-RNA 混合物迅速加入洗涤过的细胞中，37℃孵育 4h。

h. 用预热（37℃）的完全 BHK 培养基替换转染培养基。

i. 在含 5% $CO_2$ 的孵箱中将细胞 37℃孵育过夜。

j. 按如下步骤 13～16 收集重组病毒颗粒。

## 重组病毒颗粒的收集

在转染后的头 24h 内细胞可以高效的制备重组 α 病毒颗粒。通常情况下，可以获得的滴度的范围是每毫升有 $10^8$～$10^9$ 个感染颗粒。将孵育时间延长至 48h 通常可以使滴度稍微提高。

13. 在显微镜下观察可产生病毒的细胞，观察是否有污染物和细胞病变效应。
14. 小心的吸弃 BHK-21 细胞的培养基。
15. 用 0.22μm 灭菌过滤器除去细胞碎片和污染物。
16. 将病毒保存于－20℃（数周）或－80℃（数年）。

液体病毒储存物需要防止反复多次冻融，冻融将显著的降低病毒的滴度。

## 重组颗粒的激活

用传统的 DFV 和 SIN 辅助载体及分裂辅助系统制备的病毒可以直接产生感染颗粒。然而，pSFV-Helper2 载体使产生的 SFV 颗粒仅仅在某些条件下才具备感染性。在这种情况下，需要如下的激活步骤。

17. 在病毒储存液中加入 α-胰凝乳蛋白酶至终浓度为 500μg/ml。室温下孵育 20min。

18. 加入 aprotinin 至终浓度为 250μg/ml 以终止反应。

激活的 SFV 颗粒可用于感染。

**方案 2**

# 纯化方法

通常情况下，并不需要纯化或浓缩 α 病毒。然而有些情况下，例如，从 BHK 细胞培养物中获得的培养基对于原代神经元细胞是有毒性的，纯化步骤将显著提高转导神经元细胞的存活率。病毒浓度和纯度对于动物模型的体内研究是有益的，对于临床应用则是必需的。

## 材料

**注意**：当操作标有< !>的材料时请参考附录。

### 试剂

吸收缓冲液

10mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.5）

10mmol/L NaCl

亲和色谱树脂（Matrex Cellufine Sulfate，Millipore）

洗脱缓冲液（1～2mol/L NaCl 或 KCl < !>）

蔗糖（20%或 50% *m/V* 水稀释）

TNE 缓冲液

50mmol/L Tris-HCl（pH7.4）< !>

100mmol/L NaCl

0.1mmol/L EDTA

### 仪器

离心机

离心浓缩器（Millipore）

超离心管

超离心转子 SW40 Ti、SW41 Ti 或 SW28

## 方法

1. 制备（如果需要，激活）病毒储存液（方案 1）。
2. 纯化和浓缩病毒储存液。

**蔗糖梯度超离心**

a. 吸取 1ml 50%蔗糖溶液至超离心管中。

b. 小心的加入一层 3ml 20%蔗糖，建立梯度。

c. 将病毒储存液（SW41 Ti 管需要 8ml，SW40 Ti 管需要 9ml）缓慢加在梯度蔗糖溶液上面。

d. 4℃，16 000$g$ 离心 90min。

病毒带在 20%蔗糖和 50%蔗糖交界面附近。

e. 移去培养基部分和底部的 0.8ml（50%蔗糖）收集病毒。

另外一种替代方法是，可以利用 20%蔗糖垫来沉淀病毒。用 SW28 转子 4℃，25 000r/min 离心 2h，然后用 400μl TNE 缓冲液重悬病毒沉淀。

**离心浓缩**

可以用离心浓缩仪来快速而简单的浓缩病毒储存液。

a. 根据厂商说明将病毒样品加入离心浓缩仪的样品槽中。

b. 根据厂商推荐的速度离心直至液体在滤液收集槽的内部和外侧都平衡。

c. 将离心浓缩仪取下，然后揭开密封盖，弃去滤液。

d. 盖上盖子再次离心。

e. 弃去滤液，取下离心浓缩仪。

f. 收集浓缩的病毒。

如果需要更高的病毒浓度，可以再次离心。

**亲和色谱浓缩**

亲和色谱可以除去内毒素和其他污染物同时 10 倍浓缩病毒。

a. 根据厂商说明用 Matrex Cellufine sulfate 树脂装填亲和色谱柱。

b. 用数倍树脂床体积的吸收缓冲液平衡柱子。

c. 在 pH 7.5 条件下上样病毒样品。

d. 用数倍树脂床体积的吸收缓冲液洗涤柱子以除去非结合性的污染物。

e. 用洗脱缓冲液洗脱病毒。

f. 收集多个组分。通过实验感染确定病毒浓度峰值来确定组分。

## 方案 3

## 病毒滴度的确定

体外和体内使用前，确定制备的 α 病毒颗粒的滴度是很重要的。由于缺陷的 α 病毒不能产生病斑，传统的方法不能测定它们的滴度。然而，病毒的滴度可以用重组病毒表达报道基因 GFP 或 β-半乳糖苷酶的方式，通过免疫荧光方法来间接的反映出来。病毒储存物的潜能也可以用光学显微镜分析来测定。α 病毒感染的细胞的生长明显下降，由于这些细胞具有圆形的形态，因此与非感染的对照细胞有明显的区别(图 4，见彩版)。

### 材料

**注意**：标有＜ !＞的材料的处理方法见附录。

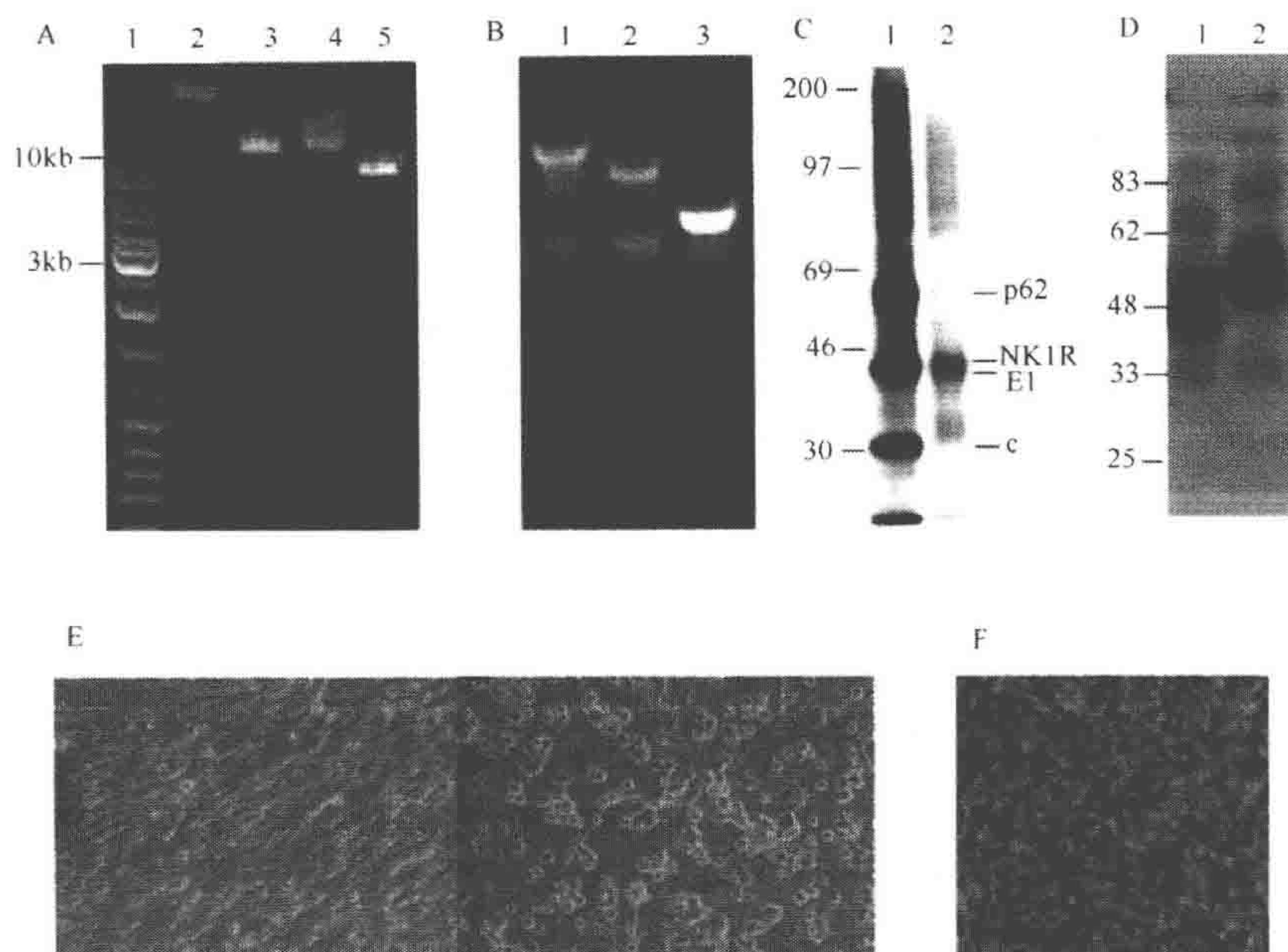



图 4. 病毒构建的各个步骤的质量控制。A. 线性化表达载体和帮助载体的乙锭染色琼脂糖凝胶电泳。(槽 1) 1kb DNA 梯度;(槽 2) pSFV-lacZ,未酶切;(槽 3) 用 *Spe*I 酶切 pSFV-lacZ;(槽 4) pSFV 帮助质粒 2,未酶切;(槽 5) 用 *Spe*I 酶切的 pSFV 帮助质粒 2。B. 体外转录 RNA 的乙锭染色琼脂糖凝胶电泳。(槽 1) pSFV-CAP-NK1R (将 neurokinin-1 受体与衣壳序列融合的 SFV 重组体);(槽 2) pSFV1-GFP;(槽 3) pSFV 帮助质粒 2。C. 电穿孔 (槽 1) 和感染 (槽 2) 的 BHK-21 细胞的代谢标记。D. 被感染的 BHK-21 细胞的 Western blot (槽 1) pSFV2genB-5HT1BR;(槽 2) pSFV2genC-5HT1BR。E. 被感染的细胞 (右边槽) 与未被感染细胞 (左边槽) 细胞之间的代谢改变。F. 被 SFV-GFP 感染的细胞的荧光显微镜照片。

## 试剂

抗体

一抗 (抗靶抗原的特异抗体)

荧光素偶联的二抗 (一抗特异性的)

BHK-21 细胞

根据研究,可以使用其他类型的细胞。

封闭缓冲液:含有 0.5% 明胶海绵和 0.25%牛血清白蛋白的 PBS

完全培养基

针对使用的细胞类型选择。

DABCO <!>

甲醇<!>

$MgCl_2$ (1mol/L)

室温保存。

Moviol 4-88

磷酸盐缓冲液（PBS）

铁氰化钾（50mmol/L）<!>

4℃保存。

亚铁氰化钾（50mmol/L）<!>

4℃保存。

溶于 DMF <!>或 DMSO <!>的 X-gal（2%）<!>

−20℃保存。

病毒储存液

按照方案 1 制备的可表达 GFP、β-半乳糖苷酶或其他目的抗原的重组 α 病毒。

### 仪器

细胞培养板（6 孔或 12 孔）

盖玻片

荧光显微镜

玻片

## 方法

### 基因表达的显示

1. 将目的细胞系接种至 6 孔或 12 孔细胞板上或盖玻片上。将细胞培养至一定的浓度。
2. 用梯度稀释的可表达报道基因或目的抗原的病毒储存液感染细胞。
3. 37℃培养细胞过夜。
4. 转染后 48h 内确定滴度。

   在早期的时间点，信号可能未达到最佳，一些突变的载体尤其是这样。在后期的时间点，细胞病变效应逐渐使细胞脱落。

   **通过检测 GFP 确定滴度**

   a. 用荧光显微镜检查细胞培养孔或盖玻片。

   b. 计数 GFP 阳性细胞（感染颗粒）。

   **X-gal 染色确定滴度**

   a. 制备新鲜的 X-gal 染色溶液，将各种储存液稀释到 PBS 中至终浓度含 5mmol/L 铁氰化钾、5mmol/L 亚铁氰化钾、2mmol/L $MgCl_2$ 和 1mg/ml X-gal。

   b. 用 PBS 洗涤细胞。

   c. 用冷甲醇−20℃固定细胞 5min。

   d. 用 PBS 洗涤细胞三次。

   e. 室温或 37℃用 X-gal 染色溶液染色细胞至少 2h。

   f. 计数 X-gal 阳性细胞。

   **通过免疫荧光确定滴度**

   a. 用 PBS 洗涤盖玻片两次。

b. 用冷甲醇－20℃固定细胞 6min。

c. 用 PBS 洗涤盖玻片 3 次。

d. 室温下用封闭缓冲液孵育 30min 以封闭非特异性的结合。

e. 用一抗代替封闭缓冲液，室温下孵育 30min。

f. 用 PBS 洗涤盖玻片 3 次。二抗室温孵育 30min。

g. 用 PBS 洗涤盖玻片 3 次，用水洗涤一次，空气中晾干盖玻片。

h. 将盖玻片在玻片上用 10μl 含 2.5% DABCO 的 Moviol 4-88 封片。

i. 用荧光显微镜观察。计数阳性细胞。

5. 将阳性细胞数与稀释倍数相乘，将滴度表示为感染颗粒数/ml。

## 方案 4

# 培养细胞系中基因表达的评估

在进行更精细或大量表达的实验之前，快速地评估制备的病毒储存液中的转基因的表达是很有用的。该实验同时也可以确定最佳的表达条件。病毒的浓度、宿主细胞系和细胞收集的时间这些因素对表达优化有着极其重要的作用。通过蛋白质印迹即可以较容易地确定目的基因产物的表达水平和大小。然而，这需要合适的抗体来识别目的蛋白质或载体中引入的标记。如果以上标准都不能满足的话，转基因表达可以通过用 $[^{35}S]$ 代谢标记细胞来测定。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

冰乙酸<!>

Amplify（Amersham）<!>

抗体

　　一抗（针对目的抗原）

　　二抗（针对一抗）

目的细胞系：BHK-21、CHO-K1、HEK 293

Chase 培养基：添加 2mmol/L 谷氨酰胺、20mmol/L HEPES 和 150μg/ml 未标记蛋氨酸的 MEM 培养基

ECL 化学发光试剂盒（Amersham）

裂解缓冲液

　　50mmol/L Tris-HCl（pH 7.6）<!>

　　150mmol/L NaCl

　　2mmol/L EDTA

　　1%（*V/V*）Nonidet P-40（Sigma-Aldrich）<!>

甲醇<!>

[$^{35}$S] 蛋氨酸<!>

牛奶

磷酸盐缓冲液（PBS）

聚丙烯酰胺

SDS <!>

饥饿培养基：添加 2mmol/L 谷氨酰胺和 20mmol/L HEPES 的无蛋氨酸的 MEM 培养基

Tris 盐缓冲液（TBS）

Tween-20

病毒储存液

根据方案 1 制备的表达目的基因的重组 α 病毒。

## 仪器

细胞培养板（6 孔、12 孔和 24 孔）

Hybond ECL 尼龙膜滤器（Amersham）

Hyperfilm-MP

放射性强度探测器

SDS-PAGE 设备

蛋白质印迹设备

## 方法

1. 用梯度稀释的病毒储存液在 6 孔、12 孔或 24 孔板上感染相应的细胞（BHK-21、CHO-K1、HEK 293）。
2. 分析基因表达。

**蛋白质印迹**

a. 在感染后不同的时间点，每个 6 孔板孔中加入 250μl 裂解缓冲液，冰上放置 10min。

b. 重悬细胞。

c. 上样样品，然后在正常标准下 10%～12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

d. 将蛋白质转到尼龙膜上。

e. 4℃下，将尼龙膜放在含 5%牛奶和 0.1% Tween-20 的 TBS 中孵育 30min。

f. 室温下将尼龙膜放在一抗中孵育 30min。

g. 室温下将尼龙膜放在二抗中孵育 30min。

h. 根据厂商说明，用 ECL 化学发光试剂盒显示特异的蛋白质带。

**代谢标记**

a. 弃去细胞的培养基并用 PBS 洗涤一次。

b. 加入饥饿培养基，37℃孵育 30min。

c. 用含 50～100$\mu$Ci/ml 的 [$^{35}$S] 蛋氨酸的饥饿培养基替代饥饿培养基。

d. 37℃孵育 20min。

e. 弃去培养基并用 PBS 洗涤一次。

f. 加入 chase 培养基，孵育 15min～3h。

g. 弃去 chase 培养基，用 PBS 洗涤一次。

h. 每个 6 孔板的孔中加入 250$\mu$l 裂解缓冲液，冰上放置 10min。

i. 重悬细胞。

j. 上样样品，然后在正常标准下 10%～12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

k. 室温下用 10%冰乙酸/30%甲醇固定凝胶 30min。

l. 用 Amplify 替换固定溶液。室温下孵育 30min。

m. 将凝胶晾干，进行放射活性鉴定并将凝胶放在 Hyperfilm-MP 中 2～24h。

n. 做 X 光片并观察放射性带。

### 原代细胞的感染

原代细胞，尤其是原代神经元，对物理和化学物质很敏感。应防止对这些细胞的多余操作，来自培养 BHK 细胞的培养基对神经元细胞有毒，建议使用对病毒储存液的纯化和浓缩步骤。

a. 从 E17 期胚胎中分离原代大鼠海马区神经元。

b. 用添加了 10% 马血清的 DMEM 培养基培养细胞。

c. 往原代细胞中直接加入合适的病毒浓缩液。

d. 防止对细胞的多余操作。

e. 做时间点测试，以确定最佳的表达条件。

## 方案 5

## 向海马区切片的组织培养物传递病毒

向海马趾切片组织培养物的递送基因需要特殊的技术和技巧。这种切片有一层神经胶质细胞覆盖，可以阻止病毒颗粒向神经元的渗透，因此建议将病毒颗粒直接人工注射进入组织的细胞外间隙。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

试剂

Cutting 培养基

10mmol/L $MgCl_2$< !>

0.5$\mu$mol/L 河豚毒素< !>

大鼠海马区切片培养物

根据滚筒管配置制备大鼠海马区的组织型切片培养物。

病毒储存液

根据方案1制备可表达目的基因的重组α病毒。

仪器

显微操纵器

微吸管

使用前灭菌。

## 方法

1. 用cutting培养基将病毒储存液10～1000倍稀释，使之可以区分单个的神经元。
2. 用消毒过的吸头吸取20～30μl病毒稀释液，用显微操纵器将病毒稀释液注射进入组织切片的椎体细胞层和粒细胞层。
3. 将吸头移到邻近的区域，每个切片重复注射10～15次。
4. 将切片放在培养基中孵育10～60s以除去河豚毒素和其他残留的病毒颗粒。
5. 将切片培养物孵育1～3d，进行表达分析。

# 方案6

# 啮齿动物体内的病毒投递

α病毒早已用于啮齿动物的定向微注射，而病毒储存液无需纯化和浓缩。然而，建议将其过滤灭菌以确保不含有细胞碎片和其他污染物。

## 材料

**注意**：当操作标有＜!＞的材料时请参考附录。

试剂

动物：大鼠或小鼠

BHK-21细胞

克他命

病毒储存液

根据方案1制备可表达目的基因的重组α病毒，使用前需要用0.22μm滤器过滤灭菌。

Xylazine＜!＞

仪器

滤器（无菌，0.22μm，微孔）

Hamilton 注射器（10μl）

注射器（不锈钢）

微型输液泵

聚乙烯管

定向设备

## 方法

在全身麻醉并伴有体温调节控制及氧气补充的情况下进行微注射。

1. 用方案 3 确定病毒储存液在 BHK-21 细胞中的大概滴度。
2. 稀释病毒，使之适用于实验条件。

   对纹状体、扁桃体或脑皮层，使用 $10^5$ 个病毒颗粒；对脑室，使用 $10^7$ 个病毒颗粒。
3. 通过每千克体重腹膜内注射 200mg 克他命和 10mg xylazine 来麻醉实验动物。
4. 根据动物调整定向设备。
5. 用不锈钢注射器吸取病毒，通过聚乙烯管连接微型输液泵和 10μl Hamilton syringe。
6. 以 0.5μl/min 的速度融合病毒溶液。
7. 将针在原位多放置 2min。
8. 将针缓慢的拿开。
9. 缝合伤口，手术后 3～4h 内使动物处于温暖的环境下。
10. 简单的健康检测（如体重、体温和食量等）和行为反应。
11. 在注射后的不同时间点，收集组织和鉴定转基因的表达。

## 致谢

感谢 Markas Ehrengruber 博士（Brain Research Institute，Zurich，Switzerland）和 Grayson J. Richard 博士（F. Hoffmann-La Roche，Basel，Switzerland）提供图 IE 及图 IF。

## 参考文献

Agapov E.V., Frolov I., Lindenbach B.D., Pragai B.M., Schlesinger S., and Rice C.M. 1998. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 12989–12994.

Altman-Hamamdzic S., Groseclose C., Ma J.X., Hamamdzic D., Vrindavanam N.S., Middaugh L.D., Parratto N.P., and Sallee F.R. 1997. Expression of β-galactosidase in mouse brain: Utilization of a novel nonreplicative Sindbis virus vector as a neuronal gene delivery system. *Gene Ther.* **4:** 815–822.

Arudchandran R., Brown M.J., Song J.S., Wank S.A., Haleem-Smith H., and Rivera J. 1999. Polyethylene glycol-mediated infection of non-permissive mammalian cells with Semliki Forest virus: Application to signal transduction studies. *J. Immunol. Methods* **222:** 197–208.

Asselin-Paturel C., Lassau N., Guinebretiere J.M., Zhang J., Gay F., Bex F., Hallez S., Leclere J., Peronneau P., Mami-Chouaib F., and Chouaib S. 1999. Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther.* **6:** 606–615.

Berglund P., Tubulekas I., and Liljeström P. 1996. Alphaviruses as vectors for gene delivery. *Trends Biotechnol.* **14:** 130–134.

Berglund P., Sjöberg M., Garoff H., Atkins G.J., Sheahan B.J., and Liljeström P. 1993. Semliki Forest virus expression system: Production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology* **11:** 916–920.

Blasey H.D., Brethon B., Hovius R., Lundström K., Rey L., Vogel H., Tairi A.-P., and Bernard A.R. 1998. Large scale transient 5-HT3 receptor production with the Semliki Forest Virus expression system. In *New developments and new applications in animal cell technology* (ed. O.W. Mertenet et al.), pp. 449–455. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Boorsma M., Nieba L., Koller D., Bachmann M.F., Bailey J.E., and Renner W.A. 2000. A temperature-regulated replicon-based DNA expression system. *Nat. Biotechnol.* **18:** 429–432.

Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., and Atkins G.J. 2005. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12. *Gene Ther.* **12:** 1253–1263.

Colmenero P., Liljeström P., and Jondal M. 1999. Induction of P815 tumor immunity by recombinant Semliki Forest virus expressing the P1A gene. *Gene Ther.* **6:** 1728–1733.

Cook D.G., Sung J.C., Golde T.E., Felsenstein K.M., Wojczyk B.S., Tanzi R.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M., and Doms R.W. 1996. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: Localization in cell bodies and dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 9223–9228.

Davis N.L., Brown K.W., and Johnston R.E. 1989. In vitro synthesis of infectious Venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: Analysis of a viable deletion mutant. *Virology* **171:** 189–204.

DiCiommo D.P. and Bremner R. 1998. Rapid, high level protein production using Semliki Forest virus vectors. *J. Biol. Chem.* **273:** 18060–18066.

Dubensky T.W., Jr., Driver D.A., Polo J.M., Belli B.A., Latham E.M., Ibanez C.E., Chada S., Brumm D., Banks T.A., Mento S.J., Jolly D.S., and Chang S.M.W. 1996. Sindbis virus DNA-based vectors: Utility for in vitro and in vivo gene transfer. *J. Virol.* **70:** 508–519.

Ehrengruber M.U., Lundstrom K., Schweitzer C., Heuss C., Schlesinger S., and Gähwiler B.H. 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7041–7046.

Forsman T., Lautala P., Lundstrom K., Monastyrskaia K., Ouzzine M., Burchell B., Taskinen J., and Ulmanen I. 2000. Production of human UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A9 using the Semliki Forest virus expression system. *Life Sci.* **67:** 2473–2484.

Frolov I. and Schlesinger S. 1994. Translation of Sindbis virus mRNA: Effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* **68:** 8111–8117.

Gähwiler B.H. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* **4:** 329–342.

Hardy P.A., Mazzini M.J., Schweitzer C., Lundstrom K., and Glode L.M. 2000. Recombinant Semliki forest virus infects and kills human prostate cancer cell lines and prostatic duct epithelial cells ex vivo. *Int. J. Mol. Med.* **5:** 241–245.

Hassaine G., Wagner R., Kempf J., Cherouati N., Hassaine N., Prual C., André N., Reinhart C., Pattus F., and Lundstrom K. 2005. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr. Purif.* **45:** 343–351.

Hovius R., Tairi A.-P., Blasey H., Bernard A., Lundstrom K., and Vogel H. 1998. Characterization of a mouse 5-HT3 receptor purified from mammalian cells. *J. Neurochem.* **70:** 824–834.

Huckriede A., Heikema A., Wilschut J., and Agsteribbe E. 1996. Transient expression of a mitochondrial precursor protein. A new approach to study mitochondrial protein import in cells of higher eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* **237:** 288–294.

Liljeström P. and Garoff H. 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* **9:** 1356–1360.

Lundstrom K. 2003a. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1610:** 90–96.

———. 2003b. Semliki Forest virus vectors for large-scale protein production. *Methods Mol. Med.* **76:** 525–543.

———. 2003c. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Exp. Rev. Vaccines* **2:** 447–459.

Lundstrom K. and Boulikas T. 2003. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2:** 471–485.

Lundstrom K. and Ehrengruber M.U. 2003. Semliki Forest virus (SFV) vectors in neurobiology and gene therapy. *Methods Mol. Med.* **76:** 503–523.

Lundstrom K., Pralong W., and Martinou J.C. 1997. Anti-apoptotic effect of Bcl-2 overexpression in RIN cells infected with Semliki Forest virus. *Apoptosis* **2:** 189–91.

Lundstrom K., Abenavoli A., Malgaroli A., and Ehrengruber M.U. 2003. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol. Ther.* **7:** 202–209.

Lundstrom K., Richards J.G., Pink J.R., and Jenck F. 1999. Efficient *in vivo* expression of a reporter gene in rat brain after injection of recombinant replication-deficient Semliki Forest virus. *Gene Ther. Mol. Biol.* **3:** 15–23.

Lundstrom K., Mills A., Buell G., Allet E., Adami N., and Liljeström P. 1994. High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur. J. Biochem.* **224:** 917–921.

Lundstrom K., Schweitzer C., Rotmann D., Hermann D., Schneider E.M., and Ehrengruber M.U. 2001. Semliki Forest virus vectors: Efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* **504:** 99–103.

Monastyrskaia K., Goepfert F., Hochstrasser R., Acuna G., Leighton J., Pink J.R., and Lundstrom K. 1999. Expression and intracellular localisation of odorant receptors in mammalian cell lines using Semliki Forest virus vectors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **19:** 687–701.

Murphy A.M., Morris-Downes M.M., Sheahan B.J., and Atkins G.J. 2000. Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles. *Gene Ther.* **7:** 1477–1482.

Olkkonen V.M., Liljeström P., Garoff H., Simons K., and Dotti C.G. 1993. Expression of heterologous proteins in cultured rat hippocampal neurons using the Semliki Forest virus vector. *J. Neurosci Res.* **35:** 445–451.

Olson K.E., Higgs S., Hahn C.S., Rice C.M., Carlson J.O., and Beaty B.J. 1994. The expression of chloramphenicol acetyltransferase in *Aedes albopictus* (C6/36) cells and *Aedes triseriatus* mosquitoes using a double subgenomic recombinant Sindbis virus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24:** 39–48.

Paul N.L., Marsh M., McKeating J.A., Schulz T.F., Liljeström P., Garoff H., and Weiss R.A. 1993. Expression of HIV-1 envelope glycoproteins by Semliki Forest virus vectors. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **9:** 963–970.

Perri S., Driver D.A., Gardner J.P., Sherrill S., Belli B.A., Dubensky T.W., Jr., and Polo J.M. 2000. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* **74:** 9802–9807.

Pettigrew M.M. and O'Neill S.L. 1999. Semliki Forest virus as an expression vector in insect cell lines. *Insect Mol. Biol.* **8:** 409–414.

Pushko P., Bray M., Ludwig G.V., Parker M., Schmaljohn A., Sanchez A., Jahrling P.B., and Smith J.F. 2000. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine* **19:** 142–53.

Ren H., Boulikas T., Söling A., Warnke P.C., and Rainov N.G. 2003. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki Forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene—A phase I/II clinical protocol. *J. Neurooncol.* **64:** 147–154.

Schultz-Cherry S., Dybing J.K., Davis N.L., Williamson C., Suarez D.L., Johnston R., and Perdue M.L. 2000. Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses. *Virology* **278:** 55–59.

Smerdou C. and Liljeström P. 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. *J. Virol.* **73:** 1092–1098.

Strauss J.H. and Strauss E.G. 1994. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58:** 491–562.

Tseng J.C., Levin B., Hurtado A., Yee H., Perez de Castro I., Jimenez M., Shamamian P., Jin R., Novick R.P., Pellicer A., and Meruelo D. 2004. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors. *Nat. Biotechnol.* **22:** 70–77.

Ulmanen I., Peranen J., Tenhunen J., Tilgmann C., Karhunen T., Panula P., Bernasconi L., Aubry J.P., and Lundstrom K. 1997. Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **243:** 452–459.

Vähä-Koskela M.J.V., Tuittila M.T., Nygardas P.T., Nyman J.K.-E., Ehrengruber M.U., Renggli M., and Hinkkanen A.E. 2003. A novel neurotropic expression vector based on the avirulent strain A7(74) of Semliki Forest virus. *J. Neurovirol.* **9:** 1–15.

Xiong C., Levis R., Shen P., Schlesinger S., Rice C., and Huang H.V. 1989. Sindbis virus: An efficient broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* **243:** 1188–1191.

# 第二十九章　使用靶向的丝状噬菌体将基因转移进哺乳动物细胞内

Andrew Baird
La Jolla Institute for Molecular Medicine, San Diego, California 92121
华中和吕青　译



## 摘要

由于其遗传的简单性，噬菌体通常用于治疗性基因转移的载体遗传性优化方法中。另外，由于噬菌体的繁殖是菌株特异性的，因此不同宿主对于遗传改造、修饰甚至对用遗传筛选来进行产量、遗传稳定性、制备和花费的优化都是同等适合的。靶向配体的选择确定了靶向噬菌体转导的特异性。由于蛋白质可以有效地被表达，并且在被分泌到细菌胞质外周空间和进入噬菌体颗粒后具有生物学活性，因此遗传靶向主要限制在蛋白质上。尽管有可能用一个成纤维细胞生长因子（FGF）2-pIII 融合蛋白来靶向噬菌体，但 FGF2 展示的效率相当低。必须根据经验来决定和优化噬菌体展示选定靶向配体的能力。另外，可以在噬菌体文库展示后筛选出靶向配体。与噬菌体结构基因相关的报道基因的方向可以影响载体转导的效率。绿色荧光蛋白表达盒在 MG4 噬菌体载体内，其方向与正义链相反，MG4 噬菌体载体的转导效率是 MG3 载体的 3 倍，MG3 载体与 MG4 载体相同，但其上的绿色荧光蛋白表达盒的方向与 MG4 载体的相反。在基因投递实验中我们也用亲和素-生物素连接来靶向噬菌体颗粒。这种方法选择配体可以不考虑配体展示遗传性的能力。

一般说来噬菌体颗粒对哺乳动物细胞是无毒的。然而，内毒素必须除去。DNA 酶的处理可以防止噬菌体的污染性复制形式对细胞的非特异性转染。在 DNA 酶处理前后，通过评估琼脂糖凝胶上的，可以监控复制形式的噬菌体 DNA 的污染。对于每一个即将使用的哺乳动物细胞系，必须优化遗传毒性处理的时机、持续时间和剂量。在转染

哺乳动物细胞后，靶向的噬菌体将不能生产感染性的噬菌体颗粒，这是因为细菌启动子可调控所有噬菌体结构基因。即使在已经表达了噬菌体蛋白质的情况下，噬菌体包装的机制和哺乳动物细胞内环境与细菌的差异都将使复制性感染的可能性微乎其微。然而，我们建议对靶向噬菌体和自主非复制型腺病毒载体使用相同的生物危害安全预防措施（BSL-2）。

## 引言

由于丝状噬菌体较容易进行基因工程的再改造，以便通过非共价的（Larocca et al. 1998）或遗传性的（Kassner et al. 1999；Larocca et al. 1999，2001；Poul and Marks 1999；Mount et al. 2004）方式将靶向配体附着到噬菌体表面，进而将基因转移到哺乳动物细胞内，噬菌体介导的基因转移为将基因转移到特定类型的细胞内提供了另外一种途径。使用报道基因，如绿色荧光蛋白、新霉素磷酸转移酶和β-半乳糖苷酶等，可以检测基因转移及后续的蛋白质表达是否成功。理论上，任何连接有合适的哺乳动物转录启动子和多聚腺苷酸化信号的基因都可以被插入配体靶向的噬菌体载体。这种再靶向配体和一个哺乳动物表达盒的结合可以为哺乳动物细胞提供取向性。这些修饰的噬菌体可以像那些非复制性动物病毒载体一样进行繁殖和操作，但又具备噬菌体载体的所有优点。

噬菌体展示是通常被用来识别那些可作为试剂的多肽和蛋白质，或其他感兴趣的颗粒的技术（Kehoe and Kay 2005）。通过将小肽置于噬菌体上，一个噬菌体颗粒可进化并优化以用于基因转移。较好的噬菌体的分子设计并不是新技术（Skiena 2001），而病毒背景中的蛋白质演化已有详细的描述（Bamford et al. 2002；Baker et al. 2005；Briones and Bastollo 2005；Casjens 2005；Hambly and Suttle 2005）。例如，Molenaar 等（2002）指出被注射进入大鼠体内后，噬菌体上的简单展示蛋白肽可以修饰它们天然的药物动力学特征。确实，几年前就有报道在体内制备具有改变了的药物动力学特征的噬菌体的可能性（Geier et al. 1973；Merril et al. 1996），这些改变是由噬菌体的衣壳组成蛋白上的一个氨基酸改变造成的（Vitiello et al. 2005）。人体的安全性实验（Bruttin and Brussow 2005）显示，T4 噬菌体可能是载体改造的一个较好的起点，但我们的研究集中在 M13 噬菌体（Larocca et al. 2002b），而其他的研究者已经开始用同样的方法来研究哺乳动物病毒系统（Spear et al. 2003；Perabo et al. 2006）。

噬菌体和其他机制介导的基因转移是时间和剂量依赖性的，也是细胞表面受体特异性的。转导的细胞在加入噬菌体 48h 后开始出现，随着时间的延长表达报道基因的细胞的比率也不断增加。噬菌体通过靶向配体与细胞表面的特异受体之间的相互作用进入细胞。相应的，自由配体或中和性的抗受体抗体（Kassner et al. 1999；Larocca et al. 1999）的竞争则可以抑制配体靶向的噬菌体转导。没有靶向配体的时候，转导很少发生甚至不发生，这是因为噬菌体颗粒对哺乳动物细胞没有天然的取向性。另外，转导在噬菌体浓度低至 100 个噬菌体/细胞时就可以发生，并不断增强直至噬菌体浓度达到 $1\times10^6$ 个噬菌体/细胞。在较高的剂量时，配体靶向的噬菌体的内化是非常高效的，并且在几乎所有细胞内都可以检测到噬菌体蛋白质。使用配体或抗体靶向的噬菌体或噬菌粒，转导效率可高达 40%（Larocca et al. 1998；Kassner et al. 1999；Larocca et

al. 1999；Poul and Marks 1999；Burg et al. 2002)。

可以通过 G418 药物从噬菌体转导的细胞中筛选靶定细胞的稳定转化子，其持续的基因表达可长达数月。噬菌体颗粒的动力学分析显示，内化后数小时内衣壳被代谢消化，而噬菌体 DNA 则可在很长时间内从细胞中分离出来。鉴于这个原因，优化细胞内转运是可行的。通常认为增加双链 DNA 合成的遗传毒性治疗可以提高单链噬菌体的转导效率（Burg et al. 2002)。可以通过将多肽导入衣壳蛋白以便对细胞进行检测或用定向分子的演化从联合文库中筛选出基因优化的噬菌体来提高转导效率（Kassner et al. 1999；Larocca et al. 1999，2001，2002a，b)。

可以在细菌中简单而方便的制备噬菌体载体，噬菌体载体可特异性的定向于某种细胞，并且具有遗传进化潜能以用于特定的用途。另外，由于丝状噬菌体在从细菌体上突出的时候能替换已合成的蛋白质外壳，它们的大小不受预先形成的衣壳的限制，因此丝状噬菌体具有包装大 DNA 插入片段的内在能力。我们成功地将长约 10kb 的噬菌体载体转导进了细胞，该载体含有两个靶向配体序列和哺乳动物细胞表达盒。由于在噬菌体中插入更长的基因片段倾向于不稳定，我们最近改造设计出了更简单更小的（6kb）的噬菌粒载体。噬菌粒载体除了含有复制起点外不含任何噬菌体 DNA 序列，因此可通过辅助噬菌体（Smith and Scott 1993；Kehoe and Kay 2005）在细菌体内或宿主本身的重新改造制备获得。丝状噬菌体载体的简单遗传学特征使它们特别适用于广泛的靶向基因转移应用（Karocca et al. 2001；Mount et al. 2004)。

pIII 衣壳蛋白的可变结构非常适合于展示一系列的生物学活性肽和蛋白质序列，同时保留噬菌体颗粒的结构完整性（Smith 1985；Smith and Scott 1993；Kehoe and Kay 2005)。例如，噬菌体可以展示具有生物学活性的激素、细胞因子和生长因子（Bass et al. 1990；Gram et al. 1993；Saggio et al. 1995；Buchli et al. 1997；Merlin et al. 1997；Souriau et al. 1997；Vispo et al. 1997)。如今，很多噬菌体介导的基因转移实验都是通过 pIII 上的靶向配体来进行的，而与 pVIII 的融合可以制备相似的靶向噬菌体或噬菌粒（Petrenko and Smith 2000；Mount et al. 2004；Kehoe and Kay 2005)。实际上，可在主要衣壳蛋白上展示多拷贝蛋白肽的噬菌体很快被内化进入哺乳动物细胞（Ivanenkov et al. 1999)。如今有很多活性的 pIII 融合蛋白的例子，但并不是所有的配体都被等同的展示。融合蛋白质被分泌至细菌胞质外周空间进而被包装进入噬菌体颗粒的潜能上的差异可以显著的影响表面展示。因此，尽管很多配体被展示在噬菌体上时是有功能的，但展示的不充分是一个瓶颈，当识别可靶向噬菌体进而转移基因至细胞内的配体时，需要考虑这个因素。另外一种方法，可以在不能应用遗传学展示的时候使用靶向配体（Larocca et al. 1998）的非共价展示。

噬菌体基因转移可以使用很多类型的配体，包括那些已从噬菌体文库中识别出来的。例如，Poul 和 Marks（1999）用一个抗 Her2 单链的抗体识别了 M13 噬菌体。而通常情况下都是通过与细胞的结合和内化来筛选噬菌体从而完成配体筛选的（Barry et al. 1996；Pereira et al. 1997；Watters et al. 1997)，我们设计了新的 LIVE 和 SNAAP 筛选方法，这两种方法可以直接筛选出用于基因转移的可结合并内化到目的细胞中的配体（Kassner et al. 1999；Burg et al. 2004)。转染细胞中反复的噬菌体感染和收集可以筛选出靶向配体的基因。在这些系统中，三四次这样的筛选即可 100 万倍的富集一个有

功能的配体。

丝状噬菌体介导的基因转移，与腺病毒相关病毒 AAV 介导的转移一样，都含有单链 DNA 的引入这一步，单链 DNA 必须被转成双链 DNA 用于转基因的表达。相应的，用可提高 AAV 效率的遗传毒性处理可以加强噬菌体介导的转导（Yalkinoglu et al. 1998），如喜树碱、羟基脲、热休克和 UV 辐射等。由于每个细胞系对遗传毒性压力的反应不同，因此这些遗传毒性处理对不同细胞系的增强效应并不相同。对 COS-1 和 PC-3 细胞的 5～10$\mu$mol/L 喜树碱、40mmol/L 羟基脲、50 $J/m^2$ UV 辐射或 7h 42.5℃热激处理可使这些细胞获得最大幅度的噬菌体介导的转导的增强。

重组的 M13 噬菌体载体通过在其基因组基因间区域内插入了一个哺乳动物的基因表达盒（Larocca et al. 1999），来将基因转移至哺乳动物细胞内。这种修饰的噬菌体载体含有来自 pEGFP-N1 载体中的 GFP 基因表达盒（Cormack et al. 1996），该表达盒编码一个变异的 GFP 蛋白，可以在荧光显微镜下观察或进行荧光激活的细胞分拣（FACS）。重组 M13 噬菌体也含有 pEGFP-N1 载体中的类人猿病毒 40（SV40）复制起点。任何可被改造用于噬菌体展示的噬菌体载体［如 fUSE5（Scott and Smith 1990)］、fAFF1（Cwirla et al. 1990）和 M13East（Giebel et al. 1995）都可以通过这种方式来将基因转移至哺乳动物细胞内，包括噬菌粒载体。当噬菌粒被辅助噬菌体补救的时候，野生型 pIII 和配体-pIII 融合蛋白整合到噬菌粒颗粒中（Kehoe and Kay 2005），形成靶向配体的单共价展示。但单共价展示有时候并不是最优的，因为噬菌体表面的配体的数目可以显著地影响结合和内化（Becerril et al. 1999）。在这种情况下，这个系统可以和不含基因 III 的辅助噬菌体一起补救噬菌粒，从而可以用于多共价展示，该方法 Raconjac 等（1997）已有描述。

## 方案

## 使用靶向定向细菌体噬菌体将基因转移至哺乳动物细胞内

如下方案描述的是使用靶向噬菌体将基因转移至哺乳动物细胞内。最终的载体虽然效率较低，但可以作为载体开发平台的起点，并且该平台可用于人体中高效、高特异性和安全的组合性体内和体外展示技术的开发。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

β-半乳糖苷酶<!>

喜树碱<!>（10mmol/L）(Sigma-Aldrich C9911) 的二甲亚砜（DMSO）溶液<!>
　　-20℃保存。

细胞培养基：RPMI 1640 + 10%胎牛血清（FBS），0.1mmol/L 非必需氨基酸，1mmol/L 丙酮酸钠，2mmol/L L-谷氨酰胺和 50$\mu$g/ml 庆大霉素

DNase I (GIBBO 18068-015)

EDTA (0.5mol/L)

固定缓冲液（含 0.925%甲醛<!>，0.02%叠氮化钠<!>和 2%葡萄糖的 PBS，pH7.4）

甘油（20%）

F′宿主菌株（Stratagene 200249 XL1-Blue 感受态细胞）

羟基脲（1.0mol/L）<!>（Sigma-Aldrich H8627）的 PBS 溶液

　－20℃保存

LB 培养基平板（1%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，0.5% NaCl，pH7.0 和 2%琼脂）

$LB^+$ 培养基平板（1%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，0.5% NaCl，pH7.0，2%琼脂和 60μg/ml 氨苄青霉素）<!>

$MgCl_2$（1mol/L）<!>

PC-3 细胞系（NCI 细胞库）和 HT1229（ATCC）

磷酸盐缓冲液（PBS）

PBS ＋ AEBSF（0.2mmol/L）（4-［2-氨乙基］苯磺酰氟）（Roche 1585916）

复制式 M13 噬菌体 DNA

SOC 培养基（GIBCO 15544-034）

氯化钠（NaCl，1.5mol/L）/30% 聚乙二醇（PEG）8000 <!>

含报道基因 GFP 的靶向噬菌体颗粒

Triton X-114（10%）

胰蛋白酶（0.25%）<!>（GIBCO 25200-056）

紫外辐射<!>（Stratalinker 紫外交联仪，Stratagene）

2×YT 肉汤培养基（1.6%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，0.5% NaCl，pH7.0 和 60μg/ml 氨苄青霉素<!>）

## 仪器

离心瓶

冷冻管

FACS/带有荧光素异硫氰酸酯（FITC）过滤设备的流式细胞仪

37℃ 和 42℃培养箱

微离心管（Eppendorf）

微量移液器

振荡摇床

注射器过滤器（0.45μm）

注射器

组织培养盘（12 孔）

管子（无菌，Falcon 2059）

55℃水浴锅

## 方法

### 细菌的转化

使用标准的分子生物学技术，将改造后含有哺乳动物表达盒的复制式重组噬菌体载体转化宿主细菌。在我们的研究中，使用了商业来源的CMV启动子和生长激素（GH）多聚腺苷酸DNA。

1. 在冰上融化100μl感受态细胞。
2. 在细胞悬液中加入1.7μl β-半乳糖苷酶，冰上孵育10min。
3. 将50ng的复制式噬菌体DNA与细胞混合后，冰上孵育30min。
4. 42℃热激细菌45s，将细菌置于冰上2min。
5. 将900μl SOC培养基加入细胞，37℃，250r/min振荡培养1h。
6. 将细胞涂布$LB^+$培养平板，37℃培养过夜。

### 靶向噬菌体颗粒的制备

使用标准的噬菌体展示技术，将所需的配体改造在glll上，从而最终的颗粒将展示可以将噬菌体靶向到哺乳动物细胞上的配体-pIII融合体。

7. 用含60μg/ml氨苄青霉素的2×YT培养基培养噬菌体转化的细菌，37℃，300r/min振荡培养细菌过夜。
8. 4℃，6000*g*离心细菌培养物10min。
9. 保留上清，加入1/5体积预冷的1.5mol/L NaCl/30% PEG。混合均匀，冰上培育2h使噬菌体沉淀。
10. 4℃，15 000*g*离心30min收集噬菌体，除去上清和并吸干所有残留的液体。
11. 用含0.2mmol/L AEBSF的PBS溶液重悬噬菌体，4℃放置30min。
12. 20 000*g*离心20～30min以除去残渣。
13. 如果需要进一步浓缩噬菌体，重复步骤9～11。
14. 加入$MgCl_2$至终浓度10μmol/L，每毫升噬菌体溶液加入6单位的DNase I。室温下放置20min，以每毫升噬菌体溶液加入10μl 0.5mol/L EDTA终止反应。
15. 立即加入1/5体积预冷的1.5mol/L NaCl/30% PEG。混合均匀，冰上放置2h使噬菌体沉淀。
16. 4℃，15 000*g*离心30min收集噬菌体，除去上清和并吸干所有残留的液体。
17. 用含0.2mmol/L AEBSF的PBS溶液重悬噬菌体，37℃放置5～15min后4℃静置30min。
18. 20 000*g*离心20～30min以除去残渣。
19. 用0.45μm滤器过滤噬菌体，20%甘油冷冻，－70℃保存。

### Triton X-114相分离除去内毒素

在任何细胞和动物研究之前除去内毒素很关键。

20. 每毫升样品加入 100μl 10% Triton X-114，冰上放置 30min，偶尔振荡一下。37℃放置 10min。
21. 室温下 14 000r/min 离心 10min，保留水相（上层）。
22. 重复相分离（步骤 20 和 21）两次。

### 滴度噬菌体用噬菌斑形成单位来确定产量

23. 37℃预热 LB 培养平板，融化上层的琼脂（LB），并放入 55℃水浴锅中。
24. 将 F′细菌培养至 $OD_{600}$ =0.5，取 300μl 细胞至每个待测的 Falcon 2059 管中。
25. 用 PBS 进行梯度稀释，起始稀释度为 100 倍（5μl 稀释至 500μl PBS 中），每个稀释度重复数次。从每个稀释度管中去 100μl 加入细菌细胞中。
26. 每个管中加入 3ml 琼脂，混匀后倒入预热的 LB 平板上层，使上层琼脂凝固，然后 37℃反置过夜。
27. 计数噬菌斑并且将噬菌斑数、稀释倍数和倒板体积相乘确定滴度（pfu/ml）。

### 培养细胞的转导

28. 将 1ml 细胞培养物接种 12 孔组织培养盘，5% $CO_2$ 温箱中 37℃培养过夜。

    通过细胞的生长速度确定种板密度。培养过夜后，12 孔盘中细胞的汇合度应该达到 25%，我们接种 PC-3 细胞的密度是 $2\times10^4$ 个细胞/孔。
29. 弃去细胞培养基并用含有噬菌体的培养基替代。最高转导效率的靶向噬菌体的典型剂量是 $10^{11}$ pfu/ml。5% $CO_2$ 温箱中 37℃培养 24～96h。如果使用了遗传毒性处理，则培养 40h。
30. 除去含噬菌体的细胞培养基，并用 PBS 洗涤以收集细胞用于报道基因分析。加入 150μl 胰酶，37℃放置 2～3min 使细胞脱离培养盘。立即加入 350μl 固定缓冲液。用有 FITC 过滤器的流式细胞仪分析细胞。

### 遗传毒性处理

噬菌体被加入培养物中，40h 后开始遗传毒性处理。对每个目的细胞系都应该优化处理的条件。

31. 对于热激和 UV 辐射，需要制备含 10%胎牛血清的细胞培养基。反之，则需要加入 1～100μmol/L 喜树碱或 10～100mmol/L 羟基脲。
32. 除去含噬菌体的培养基。用以上的遗传毒性培养基代替，或用含 10% FBS 的培养基用于热激或 UV 辐射。
33. 直接 37℃或 42℃（热激）或辐射（100～100J/$m^2$）培养 7h。
34. PBS 洗涤 3 次。
35. 加入含 10% FBS 的新鲜培养基。37℃培养 24～48h。
36. PBS 洗涤 3 次，通过直接观察 GFP 或 FACS 分析来检测遗传毒性处理效果。

## 致谢

本工作得到了 NIH 的支持。

# 参考文献


Baker M.L., Jiang W., Rixon F.J., and Chiu W. 2005. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J. Virol.* **79:** 14967–14970.

Bamford D.H., Burnett R.M., and Stuart D.I. 2002. Evolution of viral structure. *Theor. Popul. Biol.* **61:** 461–470.

Barry M.A., Dower W.J., and Johnston S.A. 1996. Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat. Med.* **2:** 299–305.

Bass S., Greene R., and Wells J.A. 1990. Hormone phage: An enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8:** 309–314.

Becerril B., Poul M.A., and Marks J.D 1999. Toward selection of internalizing antibodies from phage libraries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255:** 386–393.

Briones C. and Bastolla U. 2005. Protein evolution in viral quasispecies under selective pressure: A thermodynamic and phylogenetic analysis. *Gene* **47:** 237–246.

Bruttin A. and Brussow H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49:** 2874–2878.

Buchli P.J., Wu Z., and Ciardelli T.L. 1997. The functional display of interleukin-2 on filamentous phage. *Arch. Biochem. Biophys.* **339:** 79–84.

Burg M., Ravey E.P., Gonzales M., Amburn E., Faix P.H., Baird A., and Larocca D. 2004. Selection of internalizing ligand-display phage using rolling circle amplification for phage recovery. *DNA Cell Biol.* **23:** 457–462.

Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Gonzalez A.M., Ravey P., Baird A., and Larocca D. 2002. Enhanced phagemid particle gene transfer in camptothecin-treated carcinoma cells. *Cancer Res.* **62:** 977–981.

Casjens S.R. 2005. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr. Opin. Microbiol.* **8:** 451–458.

Cormack B.P., Valdivia R.H., and Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173:** 33–38.

Cwirla S.E., Peters E.A., Barrett R.W., and Dower W.J. 1990. Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87:** 6378–6382.

Geier M.R., Trigg M.E., and Merril C.R. 1973. Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature* **246:** 221–223.

Giebel L.B., Cass R.T., Milligan D.L., Young D.C., Arze R., and Johnson C.R. 1995. Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities. *Biochemistry* **34:** 15430–15435.

Gram H., Strittmatter U., Lorenz M., Gluck D., and Zenke G. 1993. Phage display as a rapid gene expression system: Production of bioactive cytokine-phage and generation of neutralizing monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **161:** 169–176.

Hambly E. and Suttle C.A. 2005. The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Curr. Opin. Microbiol.* **8:** 444–450.

Ivanenkov V.V., Felici F., and Menon A.G. 1999. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1448:** 463–472.

Kassner P.D., Burg M.A., Baird A., and Larocca D. 1999. Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264:** 921–928.

Kehoe J.W. and Kay B.K. 2005. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem. Rev.* **105:** 4056–4072.

Larocca D., Jensen-Pergakes K., Burg M.A., and Baird A. 2001. Receptor-targeted gene delivery using multivalent phagemid particles. *Mol. Ther.* **3:** 476–484.

______. 2002a. Gene transfer using targeted filamentous bacteriophage. *Methods Mol. Biol.* **185:** 393–401.

Larocca D., Witte A., Johnson W., Pierce G.F., and Baird A. 1998. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **9:** 2393–2399.

Larocca D., Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Ravey E.P., Gonzalez A.M., and Baird A. 2002b. Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3:** 45–57.

Larocca D., Kassner P.D., Witte A., Ladner R.C., Pierce G.F., and Baird A. 1999. Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage: *FASEB J.* **13:** 727–734.

Merlin S., Rowold E., Abegg A., Berglund C., Klover J., Staten N., McKearn J.P., and Lee S.C. 1997. Phage presentation and affinity selection of a deletion mutant of human interleukin-3. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **67:** 199–214.

Merril C.R., Biswas B., Carlton R., Jensen N.C., Creed G.J., Zullo S., and Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 3188–3192.

Molenaar T.J., Michon I., de Haas S.A., van Berkel T.J., Kuiper J., and Biessen E.A. 2002. Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: Implications for phage display. *Virology* **293:** 182–191.

Mount J.D., Samoylova T.I., Morrison N.E., Cox N.R., Baker H.J., and Petrenko V.A. 2004. Cell targeted phagemid rescued by preselected landscape phage. *Gene* **341:** 59–65.

Perabo L., Endell J., King S., Lux K., Goldnau D., Hallek M., and Buning H. 2006. Combinatorial engineering of a gene therapy vector: Directed evolution of adeno-associated virus. *J. Gene Med.* **8:** 155–162.

Pereira S., Maruyama H., Siegel D., Van Belle P., Elder D., Curtis P., and Herlyn D. 1997. A model system for detection and isolation of a tumor cell surface antigen using antibody phage display. *J. Immunol. Methods* **203:** 11–24.

Petrenko V.A. and Smith G.P. 2000. Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng.* **13:** 589–592.

Poul M.A. and Marks J.D. 1999. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol.* **288:** 203–211.

Rakonjac J., Jovanovic G., and Model P. 1997. Filamentous phage infection-mediated gene expression: Construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3. *Gene* **198:** 99–103.

Saggio I., Gloaguen I., and Laufer R. 1995. Functional phage display of ciliary neurotrophic factor. *Gene* **152:** 35–39.

Scott J.K. and Smith G.P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249:** 386–390.

Skiena S.S. 2001. Designing better phages. *Bioinformatics* (suppl.) **1:** S253–261.

Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228:** 1315–1317.

Smith G.P. and Scott J.K. 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217:** 228–257.

Souriau C., Fort P., Roux P., Hartley O., Lefranc M.P., and Weill M. 1997. A simple luciferase assay for signal transduction activity detection of epidermal growth factor displayed on phage. *Nucleic Acids Res.* **25:** 1585–1590.

Spear M.A., Schuback D., Miyata K., Grandi P., Sun F., Yoo L., Nguyen A., Brandt C.R., and Breakefield X.O. 2003. HSV-1 amplicon peptide display vector. *J. Virol. Methods* **107:** 71–79.

Vispo N.S., Callejo M., Ojalvo A.G., Santos A., Chinea G., Gavilondo J.V., and Arana M.J. 1997. Displaying human interleukin-2 on the surface of bacteriophage. *Immunotechnology* **3:** 185–193.

Vitiello C.L., Merril C.R., and Adhya S. 2005. An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than a 1000-fold. *Virus Res.* **114:** 101–103.

Watters J.M., Telleman P., and Junghans R.P. 1997. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* **3:** 21–29.

Yalkinoglu A.O., Heilbronn R., Burkle A., Schlehofer J.R., and zur Hausen H. 1988. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* **48:** 3123–3129.

# 第三十章　筛选、分离和鉴定用于配体指导基因传递的靶向肽

Martin Trepel[*], Wadih Arap[†] 和 Renata Pasqualini[†]

[*] University of Freiburg Medical Center, Department of Hematology and Oncology and Institute for Molecular Medicine and Cell Research, D-79106 Freiburg, Germany; [†] The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030-4095

张锦芳和吕青　译



## 摘要

器官内的实质、基质和血管的内皮细胞依据其组织在体内的定位和功能而表达不同的表面受体。根据受体的多样性，随机噬菌体展示多肽文库技术可以用来分离能与组织特异的细胞表面受体结合的多肽配体。按全身给药的方式投递文库后，归巢噬菌体的克隆能通过收集目标组织获得，并通过感染细菌宿主进行扩增和鉴定。收集到的多肽配体，可以用来鉴定它们相应的受体和与特定的细胞类型作用的靶向剂。组织特异性和血管生成相关的受体的功能血管图谱已经被较广泛地推广，并通过分离受体、细胞系、实验动物模型的筛选技术、体内外临床样品和直接用于患者的样品的分离技术进行了优化。最近，一类新的配体指导的腺相关病毒（AAV）和噬菌体杂交的受体已经被设计出来，用于以全身投递的方式可达到的细胞表面受体进行靶基因的转移。最终，这些进展可应用于临床。

## 引言

### 组织特异性血管受体和噬菌体展示文库的筛选

组织能表达特异性的细胞表面蛋白质，这些蛋白质不仅在实质、间质组分，而且在

其血管内皮都有分布（Trepel et al. 2002；Hajitou et al. 2006a）。其中一些细胞表面蛋白质在正常发育或病理状态下可以作为生长因子受体。而且，组织特异性内皮细胞表面蛋白质可作为组织特异性循环配体或细胞（如白细胞）的受体。这些组织特异性的内皮细胞受体按照系统标准被定义为功能血管地址素（Marchio et al. 2004）。这些确定的血管位标可通过循环系统被系统地靶向。

配体指导的靶向性包括在正常组织和病理状态下的血管地址素表达谱。这很容易通过随机的噬菌体多肽展示文库完成。这些文库是展示各种多肽（通常是大约 $10^9$ 个特异序列）的噬菌体微粒的集合（Smith and Scott 1993）。体内噬菌体文库的选择要考虑结合到组织特异的血管受体和优先到达靶器官的被展示的多肽的回收。简单地说，文库经静脉注射，经过一定的循环时间手术获得靶组织。出现在收获的组织中的，展示归巢配体的噬菌体克隆可通过细菌感染回收和再扩增。将获得的扩增混合物再次注射可富集有更佳的归巢能力的克隆展示的肽段。经三四轮的筛选后，恢复的噬菌体克隆被测序以确定 DNA 是否与被展示的插入序列一致。插入序列应该含有一些公共肽段模体（通常包括 3～5 个残基）。这种技术已经被广泛地用于体内鉴定组织特应性的配体-受体之间的相互作用。现在已经从几个正常的器官中获得了连接到组织特异性受体上的不同的肽段模式（Pasqualini and Ruoslahti 1996；Arap et al. 1998，2002a，b；Rajotte et al. 1998；Porkka et al. 1999；Trepel et al. 2001；Essler and Ruoslahti 2002；Kolonin et al. 2002，2004，2006b；Laakkonen et al. 2002；Porkka et al. 2002）。类似地，从已知的一些组织特异性受体或体外细胞过量表达的受体获得的靶多肽已经用于体内归巢的研究（Pasqualini et al. 1997；Burg et al. 1999；Arap et al. 2004；Marchio et al. 2004；Zurita et al. 2004；Giordano et al. 2005）。

## 显现中的人血管配体受体图谱

人血管受体的系统图谱（即所谓的 vascular ZIP codes）对于正在发展的临床应用性的靶向治疗是必需的。最近的研究发现人体内循环的多肽在组织中的分布不是随机的，并且从前列腺中发现了一个配体白细胞介素 11 相似的多肽（Arap et al. 2002b）。接下来，相应的白细胞介素 11 受体作为在的人前列腺癌发病过程中的形态学和功能的标志物在大量的患者样本中被鉴定（Zurita et al. 2004）。最近，方法学上的进步已经能够从小鼠的多个器官中同时联合选择配体（Kolonin et al. 2006b），并且已经过改进用于了患者（W. Arap et al. 未发表）。小鼠胰脏的研究表明，精确图谱的绘制是非常复杂的（Yao et al. 2005），组织中血管的差异性可造成同一器官中出现不同的功能分布区域。

## 靶向肽的应用

受体靶向肽有多个潜在的用途。其中包括与循环配体作用的组织特异功能性受体的鉴定（Rajotte and Ruoslahti 1999；Pasqualini et al. 2000；Giordano et al. 2001；Arap et al. 2002b；Kolonin et al. 2002，2004；Christian et al. 2003；Yao et al. 2005），靶向治疗制剂（Arap et al. 1998，2002a，2004；Ellerby et al. 1999；Koivunen et al. 1999b；Trepel et al. 2001；Curnis et al. 2002；Kolonin et al. 2004；Zurita et al. 2004）或针对目标组织的诊断试剂（Chen et al. 2004；Kolonin et al. 2006a；Souza et al. 2006）或是针对特定的

受体的靶基因转移载体（Reynolds et al. 1999；Nicklin et al. 2000，2001；Trepel et al. 2000b；Grifman et al. 2001；White et al. 2001，2004；Shi and Bartlett 2003）。最后一种应用是本章最关注的，将进行详细的讨论。

## 用于靶向转基因投递的配体指导的杂合载体

目前用于基因治疗的载体存在的问题主要有在某些组织的意外转导、免疫副反应和目标细胞转导的低效率（Somia and Verma 2000；Trepel et al. 2000a；Thomas et al. 2003）。载体的特异性提供了解决这些问题的方法。通过使用包含了抗载体抗体和针对靶受体的肽配体的双特异性分子复合物（Trepel et al. 2000b），或是将特异性肽配体插入到载体衣壳中，开发出了针对病毒载体的多肽（Girod et al. 1999；Reynolds et al. 1999；Grifman et al. 2001；Nicklin et al. 2001；White et al. 2001，2004；Loiler et al. 2003；Muller et al. 2003；Shi and Bartlett 2003；Work et al. 2004）。后者更具有优势，如便于操作、体内体外更好的稳定性、小的载体微粒更易于维护、可避免复合物引起的免疫原性。

经噬菌体展示文库分离的多肽配体序列整合到真核载体是可能的（Reynolds et al. 1999；Grifman et al. 2001；Loiler et al. 2003；Shi and Bartlett 2003；White et al. 2004），但是已经报道的成功率还不稳定。只有20%～30%的分离得到的配体多肽可以在靶向性噬菌体颗粒和修饰的普通基因转移载体衣壳蛋白（如腺病毒或AAV）上都能发挥功能。一个可能的解释就是噬菌体来源的多肽只是被筛选来与细胞或受体结合，而不是为了满足接下来的基因转移进入细胞的需要。而且，配体多肽的结合能力会随着与病毒包膜的整合而改变。综合这些限制因素考虑，基于基因治疗载体衣壳的随机多肽展示文库是为AAV（Muller et al. 2003；Perabo et al. 2003）和反转录病毒而开发的（Bupp and Roth 2003；Khare et al. 2003a，b；Hartl et al. 2005）。这个方法容许选择能特异性的结合到某种感兴趣的带有特异性病毒衣壳蛋白文本的细胞上的多肽配体。因此，这种选择可产生能特异性的高效的转导入最初选择的细胞型中的载体。

这两种方法，用于靶向性基因转移的噬菌体来源多肽的使用和位于其被选择的结构蛋白文本中的多肽的使用，现在可以结合起来。这是通过使用靶向性噬菌体颗粒自身进行基因转移来完成的。然而，细菌噬菌体的种类通常认为不适合哺乳动物细胞的转导。另一方面，噬菌体颗粒对哺乳动物细胞没有趋向性（Barrow and Soothill 1997），因此必须进行中和来重新获得靶向性，近年来，它们已经用于真核细胞的转导（Larocca et al. 1999；Poul and Marks 1999；Piersanti et al. 2004）。即使是这样，转导的低效率和免疫原性仍然是噬菌体载体在真核细胞中应用的需要克服的主要障碍。我们已经引入了AAV噬菌体（AAVP）载体系统（Hajitou et al. 2006b）。这是一种新的混合物，包括来源于AAV和单链M13细菌噬菌体衍生物的顺式元件。将AAV的反向末端重复序列整合到噬菌体的转基因盒中，是为了增强被转移的基因在胞内的表达（Hajitou et al. 2006b）。通过针对在肿瘤血管中被上调的$\alpha_v$整联蛋白，一个靶向性AAVP的模型已经成功建立起来。AAVP在载体全身给药后可以调控组织特异性的配体指导的体内的转导。AAVP介导的报道基因的转移已经被用于分子遗传影像技术和自杀基因治疗技术（Hajitou et al. 2006b）。AAVP代表了新一类的靶向性的原核/真核病毒混合载体，

它能广泛地用于生物医学领域。在此，我们主要简述体内组织靶向性噬菌体的筛选方法。将获得的噬菌体经修饰得到靶向性 AAVP 的方法随处可见（Hajitou et al. 2006b）。

## 方案 1

## 体内随机噬菌体展示文库的筛选

以下的操作归规程适用于小鼠。但是，根据噬菌体用量和噬菌体的回收方法加以修改也可用于其他物种。本程序限定一次筛选一个器官。但是，运用噬菌体展示文库同时进行多个器官的筛选的方法已经被建立了（Kolonin et al. 2006b），其原理相似于本操作规程所述。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

麻醉剂<!>

BALB/c 小鼠（2 月龄）

尽管性价比低，但裸鼠仍是最好的选择，它能将皮毛相关的菌的交差污染降到最低。大部分分离的配体的受体在不同的小鼠株中不同。

DMEM 组织培养液

K91*kan* 菌

任何其他的 F 菌毛阳性的 *Escherichia coli* 菌都可用于噬菌体扩增。

卡那霉素<!>

Luria broth 培养基

NZY broth 培养基

噬菌体展示随机多肽库

噬菌体展示随机多肽库的传代和生产已经随处可见（Smith and Scott 1993；Koivunen et al. 1999）。不同载体的几种文库已商品化。合适文库的组成有超过 $10^8$ 个不同的噬菌体多肽序列。通常，长度小于 9 个自由残基的多肽能产生较好的亲和配体被优先用于选择。较大的文库插入序列的多样性很大而不适用于实际应用。在体内靶向后的每一步对噬菌体文库的质量控制都是特别关键的。如果考虑到没有插入或者噬菌体克隆的突变，扩增文库（相对于初级文库）并不一定能够使用。

聚乙二醇（PEG）/氯化钠 NaCl<!>

溶解 100g PEG8000 和 110g NaCl 于 450ml 水中，剧烈振摇，高压锅灭菌后，边冷却边摇动。

磷酸盐缓冲液（PBS）

cocktail 蛋白酶抑制剂（Roche）

TB supplement

溶解 11.55g $KH_2PO_4$ 和 105g $K_2HPO_4$ 于 500ml $H_2O$ 中，高压灭菌。

用前按 1∶10 比例用 TB 稀释。

Terrific Broth（TB）培养基
四环素< !>
Tris 缓冲盐溶液（TBS）

仪器

套管（butterfly IV 23-gauge blue）
细胞培养瓶
玻璃研磨器
Luria Broth 琼脂平皿
摇床（37℃）
外科手术工具
注射器

## 方法

### 噬菌体展示文库的注入

1. 将选好的噬菌体文库溶于 DMEM 或 PBS，使浓度达到 $3.3 \times 10^{10}$ 转导单位（TU）/ml。
2. 将 $10^{10}$ TU 的噬菌体文库通过尾部静脉注射到受试动物体内。体积不超过 300μl。
3. 动物存活要超过 3～5min，以便于文库在体内的传播。

### 经心脏的灌注和洗涤

在手术收集目标器官之前必须进行实验动物的经心脏灌注，这样可以降低非特异性背景噬菌体的回收。但是，一些器官（如肾脏）灌注会增加非特异性背景噬菌体的聚集，使得实验结果变差。另外，灌注在首轮筛选中不建议使用，因为过度的处理会抵消多肽的结合能力，尤其是当结合的多肽数目不多时。为了减少来源于血液的背景噬菌体的回收量，如果不做灌注的话，小鼠可完全放血。

4. 确定实验动物是在深度麻醉下进行解剖的。
5. 切开表皮至横膈膜，将胸壁和腹壁暴露。
6. 开胸骨下面的腹膜，不要破坏肝脏、心脏，以及其他较大的血管。
7. 沿着 coastal arch，从下面切断。
8. 沿测线切开胸腔，从横膈膜一直到腋窝，注意不要破坏肺。
9. 将前面的胸腔壁翻开，露出心脏。用夹子固定住。
10. 将与套管的注射器内含有大约 5ml 室温的 DMEM 注射到左心室。
11. 在右心房切一小口作为血液的出口。
12. 低压灌注以防损坏血管。

    总共经心脏灌注 50ml。相对的严格性是与所用的体积直接相关的，在首次做筛选时（如果用灌注的话），可以使用少量的灌注体积。

13. 手术获取目标器官和至少一个对照器官（如肺或脑）。立即置于冰上，避免结合的噬菌体内化作用。

14. 称量器官的重量，用玻璃的组织研磨器研磨均匀。
15. 加入 1ml 冰冻的加入胰蛋白酶抑制剂的 DMEM 于组织研磨液中，涡旋，4℃，3000r/min离心 4min。除去上清液。
16. 重复步骤 15（洗涤 3 次，首次筛选可洗涤一两次）。
17. 最后一次离心完毕，除去上清液，将样品保存在冰上直至加入菌液。

## K91*kan* 菌的生长

18. 从 K91*kan* 琼脂平皿挑取一 streak 加入到 5ml 添加了 200μg/ml 的卡那霉素和 10% 的 TB supplement 的 TB 培养基。
19. 在 37℃，以通常的转速振荡培养 2～4h。

    建议在文库注射到动物体内开始培养细菌。
20. 将一部分菌液用 TB 按 1∶10 稀释，测定 $OD_{600}$。

    当 $OD_{600}$ 在 0.16～0.20，降低转速以颤声剪切瓶力。在 30min 内使用。

## 细胞颗粒中噬菌体的回收

21. 加 1500μl K91*kan* 菌液到噬菌体细胞颗粒中，轻轻重悬颗粒，要完全。37℃孵育 30min，涡旋或上下颠倒样品 10min。
22. 将细菌转移到一个 500ml 细胞培养瓶中，添加 100ml 预热的含有 0.2μg/ml 的四环素，37℃孵育 30min。
23. 从悬浮液中取出 10～100μl 于含有 40μg/ml 的四环素来计算每一个组织中噬菌体的转导单位。
24. 调整剩余菌液中四环素的浓度到 20μg/ml，37℃摇床过夜培养。

    菌液至少培养 12h，但不能超过 16h。

## 从菌液中回收噬菌体

25. 将菌液 8000r/min 离心 15min，将上清液倒入一个干净的试管。当倾倒时不要将细胞颗粒倒入试管的上部。
26. 每 10ml 上清液加入 1.5ml of PEG/NaCl，振摇，冰上孵育 1h。

    样品也可以 4℃孵育过夜。
27. 4℃，8000r/min 离心 20min，轻轻倒出上清液。
28. 将离心管放入转子中，使含有颗粒的一侧朝向转子的外侧。8000r/min 离心 5min 以除去所有的 PEG，进一步浓缩沉淀。
29. 用真空吸样器或 200μl 的吸液管将上清液迅速吸出。
30. 加 TBS 到噬菌体沉淀中（200～400μl，主要根据的量）振摇 10min。

    避免吸液管吹起泡引起噬菌体沉淀再悬浮而损害噬菌体和被展示的多肽。
31. 将溶液转移到一个 Eppendorf 管，14 000r/min 离心 10min 以除去细菌碎片。
32. 小心的上清液（噬菌体溶液）转移到一个新的 Eppendorf 管中，注意不要碰到沉淀。
33. 滴定回收噬菌体溶液（见方案 2）。
34. 重复噬菌体筛选（步骤 1～32），在每一轮的连续筛选中，所用回收的噬菌体的浓度

是 $1\times10^9\sim5\times10^9$（TU）/ml 转导单位（TU）。

3～4 个循环足够来筛选组织特异性的噬菌体。

35. 经 3 个循环筛选后要对克隆进行来源于目标组织的多肽的鉴定。

每一轮筛选的克隆数至少有 30 个，根据随机噬菌体插入的序列，我们设计的引物是 5′-GCAAGCTGATAAACCGATACAATT-3′。插入噬菌体的识别序列是 5′-GCCGACGGGGCT-插入 tGGGGCCGCTGGG-3′ 。

## 方案 2

# 噬菌体滴度

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

K91*kan* 菌
卡那霉素<!>
TB 培养液
四环素<!>

### 仪器

Luria Broth 琼脂平板
摇床（37℃）

## 方法

1. 按照方案 1，步骤 18～20 培养 K91*kan* 菌。
2. 在不同的 Eppendorf 管中，从噬菌体母液依次稀释制成 5 个浓度梯度的稀释液（方案 1，步骤 32），相当于原始母液的 $10^{-5}\sim10^{-9}$ μl。
3. 每管中加入 180μl K91*kan* 菌液。
4. 室温孵育 30min。
5. 将每管溶液中取 100μl，加到含有四环素的 LB 平板上。37℃恒温箱内过夜培养。
6. 将每个平板的菌落计数。
7. 通过稀释浓度计算克隆数来决定噬菌体溶液的 TU/μl 的数。

每个平皿上含有 20～600 个克隆是可以相信的结果。

## 致谢

本研究得到了 NIH（包括 SPORE）和 DOD（包括 IMPACT）基金的资助。并且

得到了 Gillson-Longenbaugh、Keck 基金、前列腺癌基金（给 R. P. 和 W. A.）及 Deutsche Forschungsgemeinschaft（经 M. T.）的资助。

## 参考文献


Arap M.A., Lahdenranta J., Mintz P.J., Hajitou A., Sarkis A.S., Arap W., and Pasqualini R. 2004. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell* **6:** 275–284.

Arap W., Pasqualini R., and Ruoslahti E. 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **279:** 377–380.

Arap W., Haedicke W., Bernasconi M., Kain R., Rajotte D., Krajewski S., Ellerby H.M., Bredesen D.E., Pasqualini R., and Ruoslahti E. 2002a. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 1527–1531.

Arap W., Kolonin M.G., Trepel M., Lahdenranta J., Cardo-Vila M., Giordano R.J., Mintz P.J., Ardelt P.U., Yao V.J., Vidal C.I., et al. 2002b. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med.* **8:** 121–127.

Barrow P.A. and Soothill J.S. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* **5:** 268–271.

Bupp K. and Roth M.J. 2003. Targeting a retroviral vector in the absence of a known cell-targeting ligand. *Hum. Gene Ther.* **14:** 1557–1564.

Burg M.A., Pasqualini R., Arap W., Ruoslahti E., and Stallcup W.B. 1999. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res.* **59:** 2869–2874.

Chen L., Zurita A.J., Ardelt P.U., Giordano R.J., Arap W., and Pasqualini R. 2004. Design and validation of a bifunctional ligand display system for receptor targeting. *Chem. Biol.* **11:** 1081–1091.

Christian S., Pilch J., Akerman M.E., Porkka K., Laakkonen P., and Ruoslahti E. 2003. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* **163:** 871–878.

Curnis F., Arrigoni G., Sacchi A., Fischetti L., Arap W., Pasqualini R., and Corti A. 2002. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* **62:** 867–874.

Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak, R., Rio G.D., Krajewski S., Lombardo C.R., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D.E., and Pasqualini R. 1999. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* **5:** 1032–1038.

Essler M. and Ruoslahti E. 2002. Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 2252–2257.

Giordano R.J., Cardo-Vila M., Lahdenranta J., Pasqualini R., and Arap W. 2001. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat. Med.* **7:** 1249–1253.

Giordano R.J., Anobom C.D., Cardo-Vila M., Kalil J., Valente A.P., Pasqualini R., Almeida F.C., and Arap W. 2005. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem. Biol.* **12:** 1075–1083.

Girod A., Ried M., Wobus C., Lahm H., Leike K., Kleinschmidt J., Deleage G., and Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat. Med.* **5:** 1052–1056.

Grifman M., Trepel M., Speece P., Gilbert L.B., Arap W., Pasqualini R., and Weitzman M.D. 2001. Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol. Ther.* **3:** 964–975.

Hajitou A., Pasqualini R., and Arap W. 2006a. Vascular targeting: Recent advances and therapeutic perspectives. *Trends Cardiovasc. Med.* **16:** 80–88.

Hajitou A., Trepel M., Lilley C.E., Soghomonyan S., Alauddin M.M., Marini F.C., III, Restel B.H., Ozawa M.G., Moya C.A., Rangel R., et al. 2006b. A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell* **125:** 385–398.

Hartl I., Schneider R.M., Sun Y., Medvedovska J., Chadwick M.P., Russell S.J., Cichutek K., and Buchholz C.J. 2005. Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells. *Gene Ther.* **2:** 918–926.

Khare P.D., Russell S.J., and Federspiel M.J. 2003a. Avian leukosis virus is a versatile eukaryotic platform for polypeptide display. *Virology* **315:** 303–312.

Khare P.D., Rosales A.G., Bailey K.R., Russell S.J., and Federspiel M.J. 2003b. Epitope selection from an uncensored peptide library displayed on avian leukosis virus. *Virology* **315:** 313–321.

Koivunen E., Restel B.H., Rajotte D., Lahdenranta J., Hagedorn M., Arap W., and Pasqualini R. 1999a. Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. *Methods Mol. Biol.* **129:** 3–17.

Koivunen E., Arap W., Valtanen H., Rainisalo A., Medina O.P., Heikkila P., Kantor C., Gahmberg C.G., Salo T., Konttinen Y.T., et al. 1999b. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat. Biotechnol.* **17:** 768–774.

Kolonin M.G., Pasqualini R., and Arap W. 2002. Teratogenicity induced by targeting a placental immunoglobulin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 13055–13060.

Kolonin M.G., Saha P.K., Chan L., Pasqualini R., and Arap W. 2004. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* **10:** 625–632.

Kolonin M.G., Sun J., Do K.A., Vidal C.I., Ji Y., Baggerly K.A., Pasqualini R., and Arap W. 2006a. Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. *FASEB J.* **20:** 979–981.

Kolonin M.G., Bover L., Sun J., Zurita A.J., Do K.A., Lahdenranta J., Cardo-Vila M., Giordano R.J., Jaalouk D.E., Ozawa M.G., et al. 2006b. Ligand-directed surface profiling of human cancer cells with combinatorial peptide libraries. *Cancer Res.* **66:** 34–40.

Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J.A., and Ruoslahti E. 2002. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat. Med.* **8:** 751–755.

Larocca D., Kassner P.D., Witte A., Ladner R.C., Pierce G.F., and Baird A. 1999. Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J.* **13:** 727–734.

Loiler S.A., Conlon T.J., Song S., Tang Q., Warrington K.H., Agarwal A., Kapturczak M., Li C., Ricordi C., Atkinson M.A., et al. 2003. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* **10:** 1551–1558.

Marchiò S., Lahdenranta J., Schlingemann R.O., Valdembri D., Wesseling P., Arap M.A., Hajitou A., Ozawa M.G., Trepel M., Giordano R.J., et al. 2004. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell* **5:** 151–162.

Müller O.J., Kaul F., Weitzman M.D., Pasqualini R., Arap W., Kleinschmidt J.A., and Trepel M. 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat. Biotechnol.* **21:** 1040–1046.

Nicklin S.A., White S.J., Watkins S.J., Hawkins R.E., and Baker A.H. 2000. Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* **102:** 231–237.

Nicklin S.A., Von Seggern D.J., Work L.M., Pek D.C., Dominiczak A.F., Nemerow G.R., and Baker A.H. 2001. Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective aden-

ovirus. *Mol. Ther.* **4:** 534–542.

Pasqualini R. and Ruoslahti E. 1996. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380:** 364–366.

Pasqualini R., Koivunen E., and Ruoslahti E. 1997. $\alpha_v$ integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat. Biotechnol.* **15:** 542–546.

Pasqualini R., Koivunen E., Kain R., Lahdenranta J., Sakamoto M., Stryhn A., Ashmun R.A., Shapiro L.H., Arap W., and Ruoslahti E. 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* **60:** 722–727.

Perabo L., Buning H., Kofler D.M., Ried M.U., Girod A., Wendtner C.M., Enssle R., and Hallek M. 2003. In vitro selection of viral vectors with modified tropism: The adeno-associated virus display. *Mol. Ther.* **8:** 151–157.

Piersanti S., Cherubini G., Martina Y., Salone B., Avitabile D., Grosso F., Cundari E., Di Zenzo G., and Saggio I. 2004. Mammalian cell transduction and internalization properties of λ phages displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain. *J. Mol. Med.* **82:** 467–476.

Porkka K., Laakkonen P., Hoffman J.A., Bernasconi M., and Ruoslahti E. 2002. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 7444–7449.

Porkka K., Laakkonen P., Rajotte D., Hoffman J., and Ruoslahti E. 1999. Bone marrow homing peptides from phage display libraries. *Blood* **94:** 1107.

Poul M.A. and Marks J.D. 1999. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol.* **288:** 203–211.

Rajotte D. and Ruoslahti E. 1999. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. *J. Biol. Chem.* **274:** 11593–11598.

Rajotte D., Arap W., Hagedorn M., Koivunen E., Pasqualini R., and Ruoslahti E. 1998. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J. Clin. Invest.* **102:** 430–437.

Reynolds P., Dmitriev I., and Curiel D. 1999. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther.* **6:** 1336–1339.

Shi W.F. and Bartlett J.S. 2003. RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol. Ther.* **7:** 515–525.

Smith G.P. and Scott J.K. 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217:** 228–257.

Somia N. and Verma I.M. 2000. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1:** 91–99.

Souza G.R., Christianson D.R., Staquicini F.I., Ozawa M.G., Snyder E.Y., Sidman R.L., Miller J.H., Arap W., and Pasqualini R. 2006. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1215–1220.

Thomas C.E., Ehrhardt A., and Kay M.A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4:** 346–358.

Trepel M., Arap W., and Pasqualini R. 2000a. Exploring vascular heterogeneity for gene therapy targeting. *Gene Ther.* **7:** 2059–2060.

———. 2001. Modulation of the immune response by systemic targeting of antigens to lymph nodes. *Cancer Res.* **61:** 8110–8112.

———. 2002. In vivo phage display and vascular heterogeneity: Implications for targeted medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6:** 399–404.

Trepel M., Grifman M., Weitzman M.D., and Pasqualini R. 2000b. Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **11:** 1971–1981.

White S.J., Nicklin S.A., Sawamura T., and Baker A.H. 2001. Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension* **37:** 449–455.

White S.J., Nicklin S.A., Buning H., Brosnan M.J., Leike K., Papadakis E.D., Hallek M., and Baker A.H. 2004. Targeted gene delivery to vascular tissue in vivo by tropism-modified adeno-associated virus vectors. *Circulation* **109:** 513–519.

Work L.M., Nicklin S.A., Brain N.J.R., Dishart K.L., Von Seggern D.J., Hallek M., Buning H., and Baker A.H. 2004. Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther.* **9:** 198–208.

Yao V.J., Ozawa M.G., Trepel M., Arap W., Mcdonald D.M., and Pasqualini R. 2005. Targeting pancreatic islets with phage display assisted by laser pressure catapult microdissection. *Am. J. Pathol.* **166:** 625–636.

Zurita A.J., Troncoso P., Cardo-Vila M., Logothetis C.J., Pasqualini R., and Arap W. 2004. Combinatorial screenings in patients: The interleukin-11 receptor α as a candidate target in the progression of human prostate cancer. *Cancer Res.* **64:** 435–439.

# 第三十一章 定向改良的麻疹病毒的保存和扩增

Takafumi Nakamura 和 Stephen J. Russell

The Molocular Medicine Program, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota 55905

张锦芳和吕青 译



## 摘要

反向遗传学技术可以用来从克隆的 cDNA 中获取传染性的麻疹病毒（MV）。这容许操纵病毒基因组并大大促进了对麻疹病毒复制的分子基础、宿主 病毒的相互作用和病毒致病性的研究。由于麻疹病毒是一种刚出现的具有溶瘤性质的生物介质，这种反向遗传学的方法也被应用于癌症的病毒疗法。基因工程技术已经用于开发具有新的靶向性和溶瘤的性质的麻疹病毒。然而，缺失与天然受体的相互作用使其不能在 293 或 Vero 拯救细胞中生长。为了解决这个问题，STAR 系统（6 个组氨酸标签和重新靶向）运用一个假受体和一个病毒的标签使全部再结合的病毒能被拯救和扩增，这些病毒已不能结合到天然的麻疹病毒的受体上。本操作规程提供了如何使用这个系统的详细的指示，使用这个系统，经过简单的三步操作就能迅速地产生具有新的靶向性的病毒。首先，编码靶向配体的 cDNA 被克隆进一个嵌合 H 蛋白的穿梭载体，这个载体能编码一个 C 端有 6 个组氨酸的多肽标签。接着，这个嵌合 H 蛋白编码的序列被克隆进入麻疹病毒全长的 cDNA 中。最后，具有新的靶向性的病毒可以从 cDNA 获救并在表达假受体（一种膜锚定的抗组氨酸标签抗体）的细胞中扩增。靶向性期望可以进一步提高溶瘤性麻疹病毒的治疗指标，从而尽可能少的在特异性破坏肿瘤组织时对正常组织的附带损伤。

## 引言

麻疹病毒是副黏病毒家族 *Morbillivirus* 中的一员，是一个有包膜的、基因组无分段的单链反义 RNA 病毒（Griffin 2001）。长度为 15 894kb 麻疹病毒基因组含有以

3′- N-P-M-F-H-L-5′排列的 6 个不重叠的顺反子来编码的共 8 个蛋白质。基因组紧密地与核衣壳蛋白（N）结合并形成螺旋状的核蛋白复合体，这个复合体可以作为转录和复制的模板，并且可以被包装进入子代病毒颗粒中（Griffin 2001）。P 顺反子包括三种多肽：P、C 和 V。磷酸（P）蛋白是一种分子伴侣，同 N 蛋白相互作用并且能调控 N 蛋白的细胞定位，并能协助衣壳蛋白复合物的装配。C 和 V 多肽是非结构蛋白，是从 P 蛋白的 mRNA 通过可读框变换被翻译出来的（Griffin 2001）。病毒包膜主要是由基质（M）蛋白、两个跨膜糖蛋白、融合蛋白（F）和血球凝集素蛋白（H）。M 蛋白参与病毒的出芽（Griffin 2001），M 和 F 包膜糖蛋白介导病毒感染时病毒的附着和病毒 细胞膜的融合（Cathomen et al. 1998）。H 蛋白介导病毒与靶细胞的附着，随后的融合通过 F 蛋白调节（Wild et al. 1993）。麻疹病毒的趋向性是由 H 蛋白与两个可能的细胞受体 CD46 或 SLAM 中的至少一个的结合来决定的。CD46 是一个普遍存在能调节补体活化的调节子，在所有人的有核细胞内均含有不同的量（Dorig et al. 1993；Naniche et al. 1993）。SLAM 仅在活化的 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞中表达（Tatsuo et al. 2000；Hsu et al. 2001；Minagawa et al. 2001）。最后，L 蛋白是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的多功能的催化亚单位（Griffin 2001）。

麻疹病毒是一个最近出现的具有广泛的分析和临床应用前景的新的生物介质。减毒的麻疹病毒具有很好的安全记录，并不需要高水平的防护，因为大部分人先前已经被感染或接种过麻疹疫苗，并且已经有了抗麻疹的抗体。作为用于防疫包括全身免疫缺陷病毒（HIV）、埃博拉（Ebola）病毒等流行性病毒的疫苗平台和一种用来分离和优化新的多肽配体的生物技术工具，重组麻疹病毒已经被用来分析病毒的发病机制。最重要的是，麻疹病毒具有显著的溶癌性，这点可能用于未来的癌症的病毒治疗。已经证明麻疹病毒的复制能力减弱的 Edmonston B 疫苗株（MV-Edm）在异种移植瘤模型中对人多发性骨肉瘤、卵巢癌、淋巴瘤、神经胶质瘤有抗肿瘤活性（Grote et al. 2001；Peng et al. 2001，2002；Phuong et al. 2003）。该病毒优先感染肿瘤细胞并且能诱导广泛的、最终致死性的、通过 CD46 的细胞之间的融合，因为 CD46 在肿瘤细胞中比正常细胞中表达量高（Anderson et al. 2004）。这个杀伤机制不同于大部分其他的溶癌性病毒。然而，MV-Edm 不是完全的肿瘤特异性的，它可以通过天然的受体 CD46 和 SLAM 来感染多种细胞类型。因此，靶向性是进一步提高溶癌性麻疹病毒治疗指标所必需的，从而使对周围正常组织的附带伤害降到最低并且专一的杀伤肿瘤细胞。

从克隆的 cDNA 运用反向遗传学技术来产生有感染性的麻疹病毒已经广泛地用于临床麻疹病毒分离株的分析和生产基因改良的病毒，从而促进了在分子生物学、细胞生物学和整个动物水平上对麻疹病毒发病机制的理解。第一个应用于麻疹病毒的反向遗传学系统使用的是一个 Edmonston B 疫苗株全长的 cDNA 拷贝和辅助细胞系 293-3-46（Radecke et al. 1995）。这个细胞系稳定的表达细菌噬菌体 T7 的 RNA 聚合酶和麻疹病毒的 N 蛋白和 P 蛋白。为了拯救病毒，我们将 MV-Edm 的基因组 cDNA 克隆与能编码麻疹病毒 L 蛋白的质粒共转染进入这些细胞中，导致麻疹病毒抗基因组 RNA 产生并整合到一个功能性的核蛋白复合物中。可以通过热激处理转染后的 293-3-46 细胞，然后将它们与单层的 Vero 细胞共同培养来提高这个病毒拯救系统的特异性（Parks et al. 1999）。

减毒麻疹病毒的基因组很容易通过整合人外加的转基因来扩展。扩展的重组基因组在病毒的生长中特别稳定，不容易进行重排或删除它们的外源基因。通过 H 蛋白的 C 端的多肽配体的展示可开发这个特性以便有效地使病毒获得新地靶向性。同其他病毒相比，麻疹病毒有一个特别灵活和可变的导入机制，使其可利用多种细胞受体。麻疹病毒感染的第一步，H 蛋白介导与靶细胞表面表达的病毒受体的接合并传递信号使 F 蛋白引发细胞融合（von Messling et al. 2001）。基因工程产生的 H 蛋白能通过多样的抗体受体的相互作用约束和重新靶向细胞融合。被麻疹病毒用来进入细胞的细胞表面分子的清单可被修订为癌胚抗原、CD20、CD38、表皮生长因子（EGF）受体、EGF 受体 VIII 突变体、胰岛素样生长因子（IGF）受体、主要的组织相容性多肽复合物（MHC）和 αVβ3 整联蛋白。在 C 端展示单链抗体（scFv）的嵌合 H 蛋白中，481 和 533（$H_{AA}$）位残基被丙氨酸取代可有效地消除 H 蛋白与天然受体 CD46 和 SLAM 的相互作用，这样就为产生有新地靶向性的 H 蛋白提供了一个优化平台（Nakamura et al. 2004）。但是，天然受体的切除与以上所述的病毒拯救方法中的 293 和 Vero 细胞的生长和病毒拯救是不兼容的，因为重新靶向的病毒不再连接到自身的麻疹病毒受体上。

在稳定表达人 CD38 的 Vero 细胞中拯救和扩增展示 CD38 scFv 阴性的重新靶向的麻疹病毒证明了重新靶向的可能性（Hadac et al. 2004）。CD38 的靶向病毒和非靶向的母体病毒都能有效地在 Vero-CD38 细胞中生长。此外，重新靶向 CD38 的病毒显示了期望的宿主范围的特性（不与 CD46-和 SLAM-的结合，但能有效地通过 CD38 进入细胞）。接着，发展了一个更通用的方法来拯救和扩增重新靶向的病毒，而不必经历对每一个新目标都生产一个抗原特异性病毒拯救细胞系的漫长过程。开发了一种能表达识别 6-组氨酸（H6）肽的膜锚定单链抗体的 Vero-α 细胞。将 H6 多肽连接到 H 蛋白删除后的 C 端，再与病毒整合，在 H 蛋白和它的天然受体 CD46 之间的无相互作用的情况下，具有新的靶向性的 H 蛋白可以在 Vero-α 组氨酸细胞中被拯救和增殖（图 1）。这个 STAR 拯救系统已经用于拯救展示很多不同的细胞靶向多肽配体的有新型靶向性的麻疹病毒（Nakamura et al. 2005）。

# 方案

## 改良了趋向性的麻疹病毒的拯救和增殖

STAR 系统使用一个假受体和病毒标签来拯救和增殖不能结合到麻疹病毒的天然配体上的新型靶向病毒（Nakamura et al. 2005）。这样就能发展有全新靶向性的麻疹病毒，该病毒能通过大量的细胞表面抗原和受体靶向很多肿瘤。使用这套系统，新型靶向病毒可通过三步迅速产生：①将配体 cDNA 克隆到 H 嵌合蛋白的穿梭受体；②制备编码有新型靶向性的病毒的全长 cDNA；③有新型靶向性的病毒的拯救和增殖。

### 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

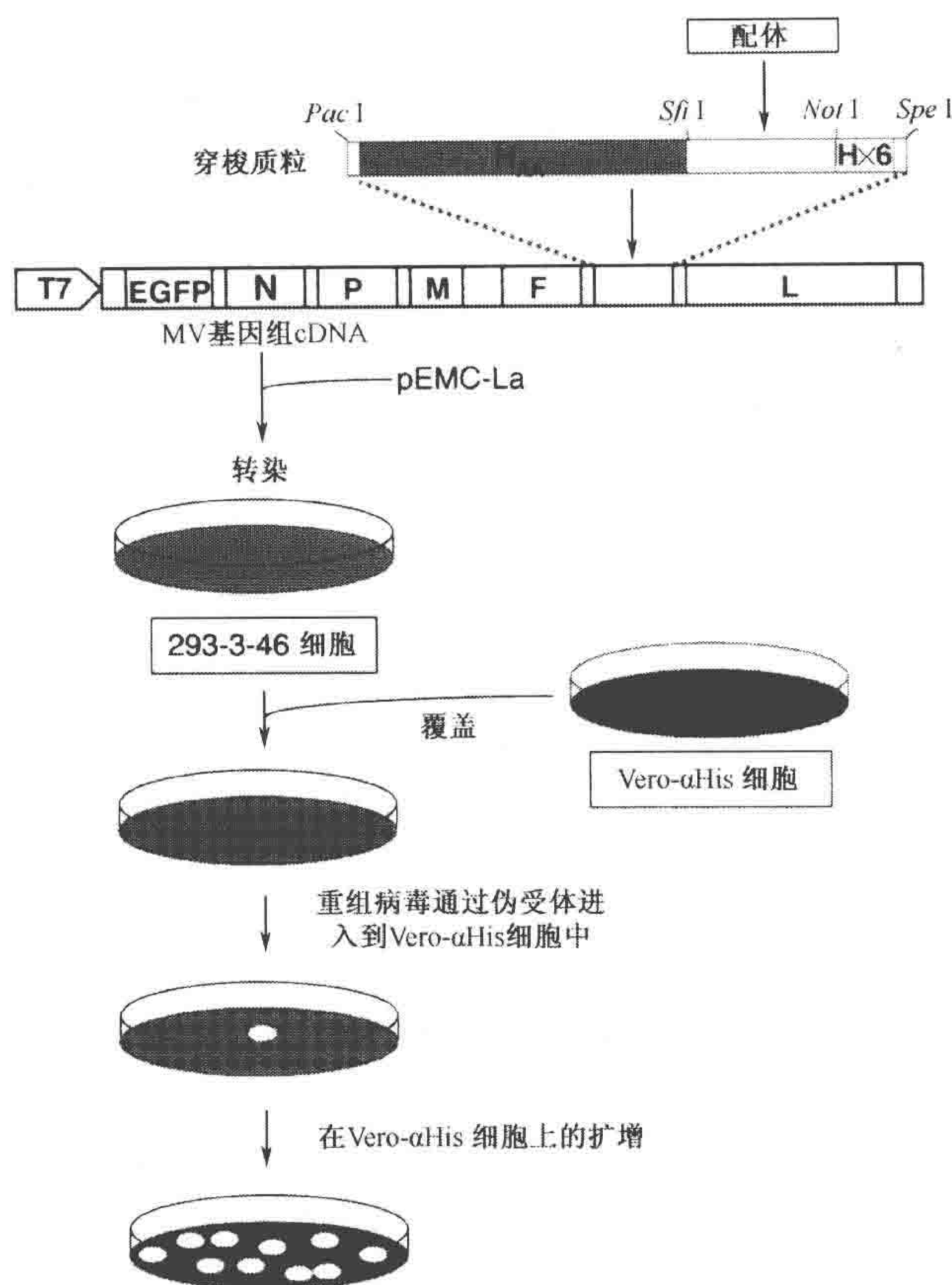



图 1. STAR 系统流程图。构建 pTNH6-Haa 穿梭载体来编码 6-组氨酸标签（H×6）和两个替换的丙氨酸（$H_{AA}$）以便去除与其天然受体的结合。增强型绿色荧光蛋白（EGFP）的 cDNA 作为一个外加的转录单位被克隆到核衣壳基因 N 的上游。EGFP 的表达提供了一个无论是在培养细胞或是小鼠的组织中都能够评估病毒感染特异性和效率的方便地手段。不同的转基因可以方便地通过 EGFP 插入序列两侧的 *MluI* 和 *AatII* 克隆位点来导入。穿梭载体被克隆进入全长麻疹病毒基因组 cDNA 并与表达 L-蛋白的 pEMC-La 质粒共转染到 293-3-46 细胞。收集细胞后，293-3-46 细胞被加入到培养的表达膜锚定抗组氨酸标签抗体假受体的单层 Vero 细胞的上层，从而进行拯救和扩增。

## 试剂

有一些厂家提供一些试剂盒，他们能提供 2×BBS、2.5mol/L $CaCl_2$、2×HBS (e.g., ProFectin Mammalian Transfection System, Promega)

2×BBS

2.1g BES

3.3g NaCl

0.04g $Na_2HPO_4$ <!>

将称好的 $Na_2HPO_4$ 溶于去离子的蒸馏水（$ddH_2O$）中，调 pH 至 6.95。0.22μm 滤膜过滤除菌。分装到 5ml 的管中－20℃保存。

$CaCl_2$ (2.5mol/L) <!>

将7.4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 溶于20ml的 $ddH_2O$，0.22μm 滤膜过滤除菌。分装到5ml的管中－20℃保存。

细胞

293-3-46 细胞

将细胞培养在1.2mg/ml G418的完全培养液中。

Vero-αHis 细胞

这些细胞培养在5% FBS和1mg/ml G418的DMEM中

完全生长培养基：含10%胎牛血清的DMEM

G418 <!>

2×HBS (HEPES-buffered saline)

2g HEPES

3.3g NaCl

0.04g $Na_2HPO_4$

将称好的 $Na_2HPO_4$ 溶于去离子蒸馏水（$ddH_2O$）中，调节pH到7.10 ±0.05，0.22μm 滤膜过滤除菌。分装到5ml的管中－20℃保存。

Opti-MEM Medium (Invitrogen )

质粒

穿梭质粒：pTNH6-Haa（偶数）和pTNH6-Haa（奇数）

以上是没有发表的载体，如有需要请向作者申请。

p（＋）MVeGFP (Duprex et al. 1999)

pEMC-La (Radecke et al. 1995)

为了得到最高的转染效率，可通过CsCl-溴化乙锭密度梯度离心或商品化的试剂盒来纯化所有质粒（如 QIAfilter Plasmid Midi Kit，QIAGEN)。

限制性内切核酸酶：*Not*I、*Pac*I、*Spe*I、*Sfi*I

胰酶<!>

## 仪器

细胞刮刀

细胞培养皿和培养板（6孔板和100mm培养皿）

孵箱37℃，5% $CO_2$

封口膜

Pipette tip（灭菌的）

Pipettors

水浴43.5℃

## 方法

### 将靶向配体插入到麻疹病毒基因组

1. 将感兴趣的多肽配体的克隆到穿梭受体的 *Sfi*I 和 *Not*I 位点。在处理H蛋白和展示

配体的可读框时应特别小心（图 1）。

为了有效地拯救，基因工程产生的麻疹病毒基因组长度应该是 6 的倍数（hexameric length）。我们因此构建了两个穿梭载体，它们在 H 蛋白 mRNA 的非编码区包含或是不包含一个 3bp 的片段的删除，依赖含有一个奇数或偶数的氨基酸的配体，分别用 pTNH6-Haa（偶数）或 pTNH6-Haa（奇数）质粒。

2. 将编码嵌合 H 蛋白的 *Pac*I/ *Spe*I 消化片段插入到全长麻疹病毒基因组的 cDNA 克隆的 p（+）MVeGFP 的位点。

## 拯救病毒的转染

3. 在转染前一天，胰酶消化收集培养在 100mm 平皿中的已融合的 293-3-46 细胞，并在重悬在 12ml 含有 1.2mg/ml G418 的完全培养液中。
4. 6 孔板的每一孔中加入 2ml 重悬的细胞，37℃孵育 20～24h。

   进行转染时，细胞的汇合度应为约 80%。
5. 在转染前 3～6h，将 6 孔板的细胞培养液吸出，换成 2ml 不含 G418 的完全培养液。
6. 分装 250μl 2×HBS 放于一无菌管中。
7. 在第二个无菌管中，将 5μg 重组的全长的麻疹病毒 cDNA 同 5～50g/L 表达载体 pEMC-La 混合，加入水至总体积 225μl。
8. 加入 25μl 2.5mol/L $CaCl_2$ 到 DNA 溶液。
9. 边搅拌边逐滴加入 DNA 溶液（步骤 8）到 2×HBS（步骤 6）。
10. 将混合溶液室温下孵育 30min，涡旋混匀。
11. 立即逐滴将溶液滴加到 6 孔板的 293-3-46 细胞中。37℃孵育 14～16h。
12. 将转染培养液换成新鲜的不含 G418 完全培养液。
13. 将转染后的 6 孔板用封口膜包住。43.5℃水浴 3h 以诱导热激。水浴完毕后继续置于 37℃培养箱中培养直至收获细胞。
14. 在覆盖前一天（如转染后 48h），用胰酶消化，收集 Vero-αHis 细胞。
15. 将 Vero 细胞转移到 10mm 的培养皿中，使浓度达到 $1.5\times10^6$～$2\times10^6$ 个/孔。然后加入含有 G418 的完全培养液。37℃孵育 14～16h。

    转染时细胞的汇合度应约为 70%。
16. 转染后 72h，用吸液管吹打细胞以分散细胞，并将单层细胞分散成小块。将分散的细胞于 5ml 的培养液中。

    不要使用细胞解离剂。
17. 将 293-3-46 细胞悬液覆盖在 100mm 培养皿中培养的 Vero-αHis 单层细胞中。37℃孵育 2～7d。

    几个感染中心可被观察到多核的合胞体，在荧光显微镜下可以看到绿色荧光表达量升高。

## 拯救病毒后的增殖

18. 在转移收获的病毒斑前一天，通过胰酶消化收集 Vero-αHis 细胞。
19. 将 Vero 细胞转移到 6 孔板，使浓度达到 $2\times10^5$ 个/孔。然后加入含有 G418 的完全培养液 2ml。37℃孵育 14～16h。

转染时细胞的汇合度应约为70%。

20. 在转移前吸出孔内的培养液，加入250μl Opti-MEM。
21. 将覆盖细胞的培养液吸出（步骤17），用P200枪和无菌的带滤膜的枪头刮下和选择每一个病毒斑。
22. 将噬菌斑转移到6孔板的Vero-αHis单层细胞中。37℃孵育3h以促使感染的发生。
23. 加入2ml不含G418的完全培养液。37℃孵育2～5d以感染Vero细胞。

    在合胞体内的噬菌体少于50%时，定期的观察细胞。

24. 小心地将培养基全部吸出，加入1ml Opti-MEM，将细胞刮入培养液。
25. 将细胞进行两次冻融。
26. 将悬浮液2000r/min离心10min以沉淀细胞碎片，吸出并保存澄清的细胞裂解液作为一级母液。

    −80℃储存。

27. 通过胰酶消化，收集指数生长期的Vero-αHis细胞。将细胞转染到10mm的培养皿中，使浓度达到$1.5\times10^6$～$2\times10^6$个/盘。
28. 加入10ml含有1.0mg/ml G418的完全培养液，37℃孵育14～16h。
29. 用200～300μl一级母液在1ml Opti-MEM中来感染细胞，37℃孵育3h。
30. 加入不含G418的完全培养液9ml。37℃进一步孵育感染的细胞2～3d。
31. 当合胞体内的细胞超过80%时，小心地吸出培养液，每孔加入1ml Opti-MEM。
32. 重复步骤24～26来制备二级母液。

    分装储存病毒于−80℃

## 病毒储存液的滴度

33. 将过夜的Vero-αHis细胞以7000个/100μl/孔，接种96孔板。
34. 在Opti-MEM中，从1∶10～1∶$10^7$连续梯度稀释二级病毒储存液（10倍稀释度）。
35. 将每一个稀释度50μl加入8孔。37℃培养6d。
36. 计算每一个孔的合胞体的阳性和阴性。
37. 通过Spearman和Karber公式计算$TCID_{50}$值

$$\log10\ (TCID_{50}/ml) = L + d\ (s - 0.5) + \log10\ (1/v)$$

式中，$L$是大多数浓缩的病毒稀释样品的以10为底的负对数；$d$是稀释倍数的log10；$s$是个别比率（pi）的总和；pi是计算的个别稀释比率（如阳性孔/全部的孔/稀释）；$v$是接种的体积（ml/well）。举个例子，使用表1的数据：

$$\log10(TCID_{50}/ml) = 1 + \{1\times[(8/8+7/8+2/8+0/8)-0.5]\} + \log10\ (1/0.05)$$
$$= 1 + (2.125 - 0.5) + 1.3$$
$$= 3.925$$
$$TCID_{50}/ml = 8.41\times10^3$$

**表1. 病毒储存液滴度的数据**

| 病毒稀释倍数的log10 | pi | 病毒稀释倍数的log10 | pi |
|---|---|---|---|
| −1 | 8/8 | −3 | 2/8 |
| −2 | 7/8 | −4 | 0/8 |

## 病毒的大规模增殖

38. 通过胰酶消化，收集 Vero-αHis 细胞。
39. 将细胞转移到 10mm 的培养皿中，使浓度达到 $1.5\times10^6\sim2\times10^6$ 个/孔。加入 10ml 含有 1.0mg/ml G418 的完全培养液，37℃孵育 14～16h。
40. 将二级母液用 1ml 的 Opti-MEM 来感染细胞，感染度达 0.02。
41. 重复步骤 29～32。当合胞体的细胞超过 80%时收集细胞裂解液。

    分装储存病毒于－80℃

42. 按照步骤 33～37 测定病毒滴度。

    病毒滴度为 $10^6\sim10^7$ $TCID_{50}$/ml 即可很好地应用于体内或体外的实验。

## 致谢

本工作得到了 NIH 基金 CA100634、HL66958 和 Harold W. Siebens Foundation 的资助。

## 参考文献

Anderson B.D., Nakamura T., Russell S.J., and Peng K.W. 2004. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* **64:** 4919–4926.

Cathomen T., Naim H.Y., and Cattaneo R. 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J. Virol.* **72:** 1224–1234.

Dorig R.E., Marcil A., Chopra A., and Richardson C.D. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75:** 295–305.

Duprex W.P., McQuaid S., Hangartner L., Billeter M.A., and Rima B.K. 1999. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J. Virol.* **73:** 9568–9575.

Griffin D.E. 2001. Measles virus. In *Fields virology*, 4th edition (ed. D.M. Knipe and P.M. Howley), pp. 1402–1442. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.

Grote D., Russell S.J., Cornu T.I., Cattaneo R., Vile R., Poland G.A., and Fielding A.K. 2001. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* **97:** 3746–3754.

Hadac E.M., Peng K.W., Nakamura T., and Russell S.J. 2004. Reengineering paramyxovirus tropism. *Virology* **329:** 217–225.

Hsu E.C., Iorio C., Sarangi F., Khine A.A., and Richardson C.D. 2001. CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **279:** 9–21.

Minagawa H., Tanaka K., Ono N., Tatsuo H., and Yanagi Y. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J. Gen. Virol.* **82:** 2913–2917.

Nakamura T., Peng K.W., Harvey M., Greiner S., Lorimer I.A., James C.D., and Russell S.J. 2005. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat. Biotechnol.* **23:** 209–214.

Nakamura T., Peng K.W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Cattaneo R., and Russell S.J. 2004. Antibody-targeted cell fusion. *Nat. Biotechnol.* **22:** 331–336.

Naniche D., Varior-Krishnan G., Cervoni F., Wild T.F., Rossi B., Rabourdin-Combe C., and Gerlier D. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **67:** 6025–6032.

Parks C.L., Lerch R.A., Walpita P., Sidhu M.S., and Udem S.A. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J. Virol.* **73:** 3560–3566.

Peng K.W., Ahmann G.J., Pham L., Greipp P.R., Cattaneo R., and Russell S.J. 2001. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* **98:** 2002–2007.

Peng K.W., TenEyck C.J., Galanis E., Kalli K.R., Hartmann L.C., and Russell S.J. 2002. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* **62:** 4656–4662.

Phuong L.K., Allen C., Peng K.W., Giannini C., Greiner S., TenEyck C.J., Mishra P.K., Macura S.I., Russell S.J., and Galanis E.C. 2003. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **63:** 2462–2469.

Radecke F., Spielhofer P., Schneider H., Kaelin K., Huber M., Dotsch C., Christiansen G., and Billeter M.A. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* **14:** 5773–5784.

Tatsuo H., Ono N., Tanaka K., and Yanagi Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406:** 893–897.

von Messling V., Zimmer G., Herrler G., Haas L., and Cattaneo R. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. Virol.* **75:** 6418–6427.

Wild T.F., Fayolle J., Beauverger P., and Buckland R. 1994. Measles virus fusion: Role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J. Virol.* **68:** 7546–7548.

# 第三十二章　基于小 RNA 病毒的表达载体

Steffen Mueller 和 Eckard Wimmer

Department of Molecular Genetics and Microbiology, Stony Brook University, Stony Brook, New York 11794

张洪杰　译



## 摘要

小 RNA 病毒包括一大群小的、无荚膜的、正义单链 RNA 病毒。小 RNA 病毒的生活周期很快，完全在细胞质内进行，而不需要整合到宿主细胞的基因组或经历一个核相。由于它们在生物学和遗传学上的局限性，其在通常的基因转移上的应用受到了限制。然而，它们可能适于作疫苗载体。此外，小 RNA 病毒介导的多种报道基因或者外源 RNA 元件（foreign RNA element）的表达都令小 RNA 病毒分子病毒学家们非常感兴趣。

## 引言

小 RNA 病毒的基因组，以最著名的肠病毒和鼻病毒为例，包含一个大约 7500 个核苷酸的单链正义 RNA 分子（图 1A）。进入宿主细胞的细胞质后，基因组 RNA 行使 mRNA 的功能，编码一个大约 2200 个氨基酸的病毒多蛋白。在病毒编码的蛋白酶族（moietie）$2A^{pro}$、$3CD^{pro}$ 和 $3C^{pro}$ 催化下，多蛋白经过一系列协调的自我催化剪切，产生了一组病毒增殖所必需的有功能的病毒蛋白质。真核生物 mRNA 5′端具有典型的 $m^7G$ cap，而病毒 RNA 在 5′端连接有一个病毒编码的末端小蛋白质，VPg。前 100 个左右核苷酸形成一个二级结构对于基因组复制特别重要，在肠病毒和鼻病毒中，由于其特征性的三茎环结构，又被称为三叶草。相关的大的 5′非翻译区（600～1100nt）主要是一个用于组装翻译起始复合物的顺式作用元件。因为组装过程不在 5′端发生而且独立于 5′$m^7G$ cap，这个遗传元件被称为内部核糖体进入位点（internal ribosomal entry site, IRES）。事实上，大多数的小 RNA 病毒通过病毒介导的蛋白质水解剪切正常的翻译起始因子 eIF4G 和帽结合复合物的一个元件 eIF-4F，非常有效地关闭了宿主细胞的帽依

赖（cap-dependent）翻译。小 RNA 病毒基因组 3′端包含一个短的非翻译区和一个病毒编码的多腺苷酸尾（polyA），它们都与基因组复制有关。

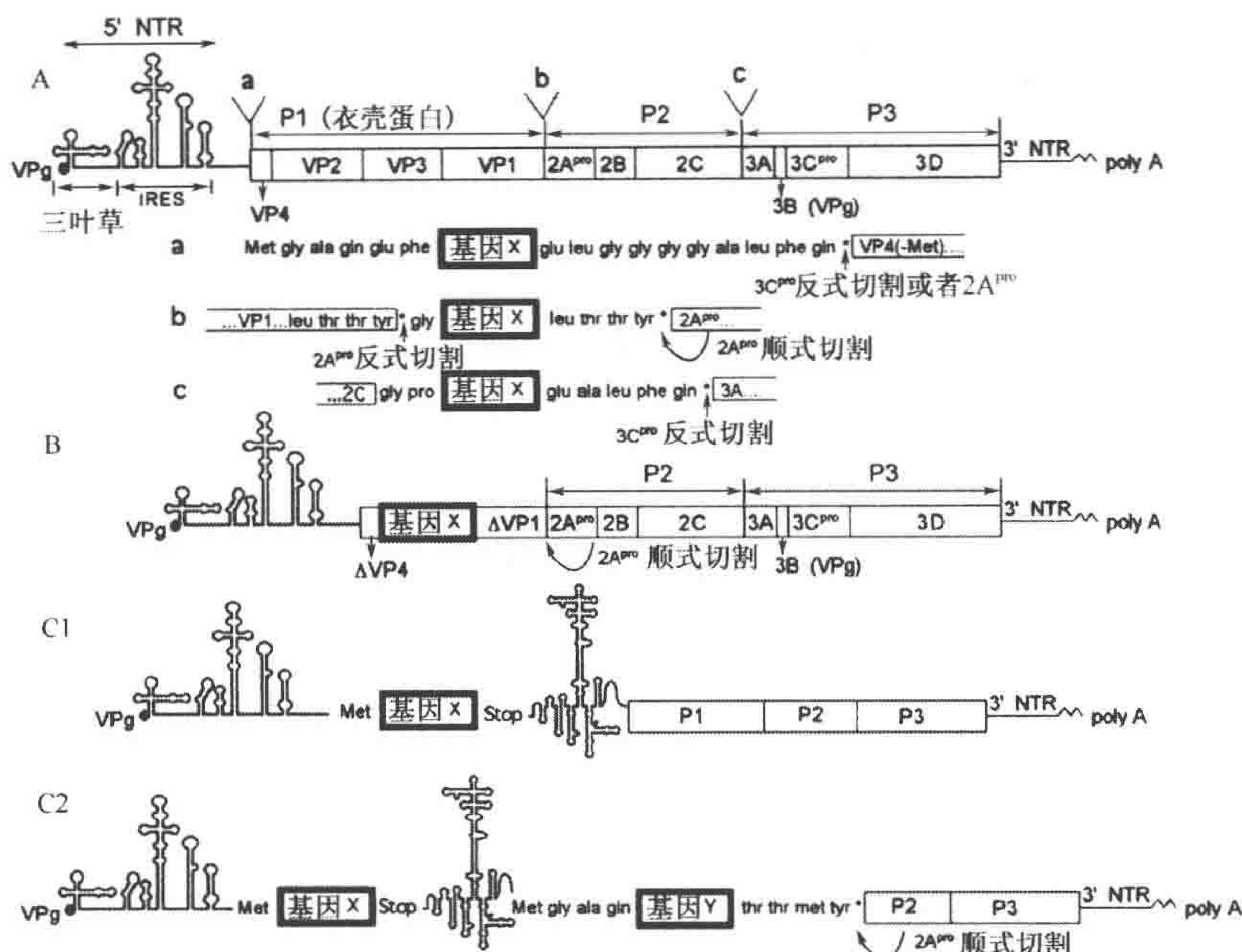



图 1. 各种 PV 载体。A. 多蛋白融合载体。框内编码序列的 3 个插入位点的位置（a、b、c）在 PV 基因组中标示出来，下面还有更为细致的有代表性的插入位点示例图。B. 亚基因组复制子。一个框内蛋白编码序列替换了部分或者全部的衣壳蛋白编码序列。C1. 双顺反子病毒。原有的 PV IRES 起始表达一个外源基因蛋白质，另外一个脑心肌炎病毒 IRES 起始翻译整个的 PV 特异性蛋白质。C2. 双顺反子复制子。与 C1 类似，但是其大部分的衣壳蛋白编码序列被删除。

在这里我们重点介绍由骨髓灰质炎病毒发展而来的载体策略。但是，由于小 RNA 病毒家族的相似性，这些技术可以，事实上有一些已经应用于许多其他的小 RNA 病毒。如果想了解更多的关于骨髓灰质炎病毒的生物学特性，可以参阅 Mueller 等(2005)。

## 使用骨髓灰质炎病毒表达外来序列

大部分的小 RNA 病毒的生活周期很短（6～7h），由于几个基因产物（$2A^{pro}$、$3CD^{pro}$、$3C^{pro}$）具有细胞毒性，典型的感染产生特征性的细胞病变效应（CPE），最终导致宿主细胞裂解。因此小 RNA 病毒载体只能进行短暂的表达。这个特性的好处在于，短暂的感染引起宿主免疫系统的清除，很少会有持续的感染。小 RNA 病毒一般通过肠胃道和呼吸道表皮感染，引起强烈的黏膜免疫应答。所以，它们可能适用于做重组疫苗载体。

小 RNA 病毒在遗传上是最低限要求者。它们的基因组经过长期的进化改进，没有任何一个基因产物能被省去。所以，只有相对小的外源基因序列能够插入，而且要使基

因组保持在能够包裹入衣壳的最大限度之内。因为病毒 RNA 聚合酶的低保真度，小 RNA 病毒在复制的过程中是高致错的，而且还经常出现同源或非同源的重组事件。通过改进复制和包装更小的基因组的能力来连续删除插入的片段导致了对较小基因组的迅速选择。一般来说，插入的片段越大，对删除变异的选择就出现得越快。虽然有报道说带有外源基因的重组基因组达到野生型的 117%依然是可行的（Alexander et al. 1994），只有大概 105%的时候才能真正保持稳定（Mueller et al. 1998）。所有以小 RNA 病毒为基础的载体的最大缺点就是遗传上的不稳定性（Mueller and Wimmer 2000；Crotty and Andino 2004）。不同类型的小 RNA 病毒为基础的表达载体的优缺点总结在表 1 中。

**表 1. 一些小 RNA 病毒表达载体的主要特点**

| 载体类型 | 优点 | 缺点 |
| --- | --- | --- |
| 多蛋白融合病毒 | 1. 便于传播<br>2. 免疫原性好 | 1. 插入片段小（最大 1.1kb）<br>2. 遗传不稳定 |
| 双顺反子病毒 | 1. 便于传播<br>2. 可靠的蛋白质表达（没有融合氨基酸） | 1. 可插入片段最小（最大 600nt）<br>2. 遗传不稳定 |
| 亚基因组复制子 | 1. 没有侵染性的病毒（安全性好）<br>2. 可插入片段最大（3kb）<br>3. 遗传上较稳定 | 1. 衣壳的包被需要辅助病毒或者反式表达的衣壳蛋白<br>2. 扩增消耗大<br>3. 需要在外源蛋白的氨基端和羧基端加入融合多肽 |
| 双顺反子复制子 | 1. 没有侵染性的病毒（安全性好）<br>2. 可插入片段大（2.4kb）<br>3. 可靠的蛋白质表达（没有融合氨基酸） | 1. 衣壳的包被需要辅助病毒或者反式表达的衣壳蛋白<br>2. 扩增消耗大 |

## 多蛋白融合载体

多蛋白融合载体是最常用到的一种小 RNA 病毒载体类型（Andino et al. 1994）。一段外源基因编码片段可以插入到可读框中，并且病毒基因产物的表达不受影响。已经证实有 3 个不同的插入位点：如在病毒多蛋白的上游的氨基末端（图 1Aa）（Andino et al. 1994；Mattion et al. 1994；Mueller and Wimmer 1998；Dobrikova et al. 2003）、在衣壳序列和 $2A^{pro}$之间（图 1Ab）（Mattion et al. 1994；Mandl et al. 1998）、在 2C 和 3A 之间（图 1Ac）（Paul et al. 1998）。其中位于 P1 衣壳区和 $2A^{pro}$之间的插入位点是最好的。外源蛋白质添加一个 Leu-Thr-Thr-Tyr * Gly 的裂解识别位点就可以被蛋白酶 $2A^{pro}$从多蛋白上切割下来。因此氨基端切割发生在 VP1 的最后一个氨基酸（Tyr）和外源蛋白质的氨基端的 Gly 之间。在羧基末端，Tyr 和 $2A^{pro}$的氨基端氨基酸 Gly 之间的顺式切割最少需要添加 Leu-Thr-Thr-Tyr（图 1Ab）。虽然以前的多蛋白融合载体使用 $3C^{pro}$切割位点，但是 $2A^{pro}$介导的反式切割更为有效（Tang et al. 1997；Zhao et al. 1999）。

## 亚基因组复制子

在高复数感染中，会产生有缺陷（defective interfering，DI）的干扰颗粒。这些颗粒的基因组在衣壳编码区中都有大片段的框内缺失。DI 基因组保留了所有的复制功能，通过野生型辅助病毒的协助反式作用包裹入衣壳（Wimmer et al. 1993）。可以将脊髓灰

质炎病毒的部分或全部替换为外源编码序列，使其表达（图 1B）（Choi et al. 1991；Percy et al. 1992）。因为（至少在肠病毒中）几乎全部衣壳编码区可以被替换，复制子策略使得可以插入最大可能的片段（理论 3.5kb，实际 2.4kb）。在目前所知的所有复制子构建中，VP4 氨基端最少需要三氨基酸（GAQ），VP1 羧基端需要四氨基酸（LT-TY）和外源蛋白质融合。虽然前者不是必需的，而后者对于 2A 顺式切割从多蛋白中释放外源蛋白质和为 2A 产生有效氨基末端是非常重要的。其他的小 RNA 病毒（如鼻病毒），包含一个基本的 RNA 结构被称为顺式复制元件（cre），该结构不可删除（McKnight et al. 1996）。正如 DI 基因组，重组亚基因组复制子也可以在野生型辅助病毒反式产生的衣壳先导蛋白 P1 的协助下包裹入衣壳。或者，在脊髓灰质炎病毒中，可以使用重组疫苗病毒预感染提供衣壳先导蛋白 P1，从而产生包含有复制子基因组的具感染性的病毒颗粒（Porter et al. 1996）。衣壳包被的复制子可以在 VV-P1 存在的情况下通过连续传代扩增。这种方法还有一个优点就是根据衣壳包裹的复制子的不同物理特性，可以比较容易地从 VV-P1 辅助病毒中提纯；PV 颗粒有不同的沉降系数，对强去垢剂和低 pH 有抵抗力。对于一个野生型 PV 辅助病毒，衣壳包被的复制子的分离是不可能的。亚基因组复制子比其他载体更为稳定，大概是因为它们的基因组大小和野生型相等甚至更小。

### 双顺反子病毒载体

在双顺反子 PV 病毒的构建中，通过插入第二个 IRES，病毒多蛋白被分为两部分分别翻译（Molla et al. 1992）。这种方法被改进为构建双顺反子表达载体，第一个 IRES 翻译外源基因，第二个 IRES 翻译整个病毒的多蛋白（图 1C1）（Alexander et al. 1994）。这种构建方法的一个长处就是在氨基端和羧基端都不需要整合多肽就可以表达外源蛋白质。但是，它的可插入片段变得更小，因为大部分的插入空间被第二个 IRES 所占据。所报道的应用双顺反子 PV 表达的最大的蛋白质是氯霉素基因（26kDa），总基因组大小是野生型的 117%。萤火虫萤光素酶基因的插入（67kDa）使基因组大小上升到了野生型的 131%。这超过了组装的限制，导致致死型（Alexander et al. 1994）。

### 双顺反子复制子

虽然上述的双顺反子载体产生了可用的病毒，应用同样的技术，移除病毒衣壳编码序列也可以构建出双顺反子复制子（图 1C2）。这为插入更大的片段（2～2.5kb）释放了空间，甚至可以表达两个不同的外源基因（Zhao et al. 2001），同时又将基因组的大小维持在可以包裹入衣壳的最大限制内。与它们单顺反子的副本一样，双顺反子复制子也可以在 VV-P1 的帮助下反式包裹入衣壳（Johansen et al. 2000）。采用这种方法构建了非常重要的双顺反子丙肝病毒复制子，在当前的细胞丙肝病毒研究中应用非常广泛（Lohmann et al. 1999）。

## 方案

# 重组小 RNA 病毒基因组导入细胞

将重组小 RNA 病毒基因组导入细胞的基础在于分离的病毒颗粒 RNA 具有感染性。这种特性扩展到在体外只要 5′端的序列存在就能够进行转录。也就是说，（T7 RNA 聚合酶进行体外转录残留下来的）5′端多出来的两个鸟苷酸残基，虽然会使病毒降低感染力，但还是可行的。3′端多余的核苷酸则更不用说。因此，在 poly（A）下游［与 poly（A）距离越近越好］任何一个唯一的限制酶酶切位点都可以用来将包含病毒基因组的质粒线性化，以用于体外转录。

## 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖

小牛血清

二乙氨乙基葡聚糖（DEAE-dextran)(0.5mg/ml；$M_r$＝500 000；Sigma-Aldr-ich）<！>

消过毒的 Falcon tube 中加入 20mg 二乙氨乙基葡聚糖，40ml HBSS。剧烈振荡 5min。可以在 4℃ 保存 1 个月。

DNase（不含 RNase，Roche 10776785001）

DMEM（不含血清，Invitrogen 11965-092）

不同的细胞类型可能需要其他的培养基。

乙醇［70%（*V*/*V*）和 100%］<！>

Hank 平衡盐溶液（HBSS；Invitrogen 14025-092）

HeLa R19 细胞（对数生长期）

$H_2O$（超纯水）

使用超纯水和 RNA 实验专用的化学药品就不用再对溶液进行高压灭菌或者 DEPC（焦炭酸二乙酯）处理。

体外 T7RNA 聚合酶试剂盒（Stratagene 600124，或者相似的试剂）

苯酚：氯仿［50：50（*V*/*V*)］<！>

质粒

构建质粒应该将重组病毒或者表达所需基因的复制基因组插入到一个 T7 RNA 聚合酶的启动子后面。

适当的限制性内切核酸酶，用于质粒的线性化

TAE 缓冲液

40mmol/L Tris<！>

1mmol/L EDTA

20mmol/L 乙酸<!>

仪器

CentriSpin 20 columns（Princeton Separations，CS-201 或者类似物）

EP 管

冰箱（$-80℃$）

培养箱（37℃，$CO_2$）

离心机

摇床

细胞培养皿（直径 35mm）

## 方法

### 重组 RNA 的转录

一个 50μl 的转录反应应该可以产生 5～20μg 的 RNA，足够用于转染几个 35mm 平皿。大概每一个 35mm 平皿的用量为 2μg RNA。如果需要转染更多的平皿，可以相应地增加转录反应量。

1. 线性化 1～2μg 包含有目的基因的病毒或复制子的质粒。
2. 使用商业化的 T7 RNA 聚合酶试剂盒在体外对线性模板进行转录，最终反应容量为 50μl，可参阅产品说明。

   转录完成后，可以加入 10 单位的 DNase（不含 RNase）37℃温育 15min 去除模板 DNA，此步可省略。
3. 确定 RNA 浓度。
4. 在 CentriSpin 20 column 中提纯 RNA（或者相似的去盐离心柱），可参阅产品说明。

   另外，还可以用苯酚∶氯仿抽提，然后用乙醇洗涤。如果 RNA 转录产物的浓度已经足够高（>200ng/μl），RNA 提纯就可以省略。
5. 使用 TAE 缓冲液，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，估计 RNA 的质量和完整性。
6. 立即使用 RNA 进行转染或者在$-80℃$下冷藏待用。

### RNA 转染细胞

7. RNA 转染前 24h，将处于对数生长期的 HeLa R19 细胞接种于 35mm 平皿。

   转染时，细胞应该达到 50%～70%的汇合度。
8. 对于每一个将要进行转染的平皿，混合 2μl 体外转录 RNA（步骤 6 中获得）和 300μl 二乙氨乙基葡聚糖（DEAE-dextran）。冰上孵育 30min。

   每 300μl 的 DEAE-dextran 加入 RNA 不应超过 10μl，如果体外转录后，RNA 浓度已经高于 200ng/μl，可以直接加入而不用提纯，即可省略步骤 4。
9. 转染前，用冷 HBSS 洗 HeLa 单层细胞两次。
10. 从平皿中吸出 HBSS，在每个平皿中加入 300μl DEAE-dextran/RNA 混合物。放在

摇床上，室温振荡 30min。

需要加入一个对照平皿，即没有加 RNA，其他操作相同。实验中要确保细胞不干。

11. 每个平皿中加入 2ml 预热的 DMEM（不含血清）。37℃ 含 $CO_2$ 保温箱培养 1h。
12. 吸出培养基，加入预热的 DMEM（含 2%小牛血清）。再次放入 37℃ 含 $CO_2$ 保温箱培养。
13. 定期检查平皿细胞病变效应（CPE）或检测插入基因的表达情况（复制子或重组病毒）。

亚基因组 PV 复制子的蛋白质表达最多经历 6～12h 的后转染。因为没有合成具有侵染性的病毒颗粒，也不会转染其他的细胞。随着转染细胞的死亡，表达也迅速的减少。病毒构建物转染的细胞在后转染的前几个小时表现相似。但是，有感染性的颗粒增殖、传播，杀死平皿中的所有细胞。对于野生型的 PV RNA，在后感染 24h 内就可以观察到完整的 CPE。以病毒为基础的表达载体经常会有标志性的延时 CPE（直到 4d 后）。一般来说，CPE 出现比野生型病毒延时的时间代表了构建物合适度和遗传稳定性的降低。

14. 反复冻融平皿 3 次，使得病毒从细胞中释放出来。
15. 将所得液体转入 EP 管中，14 000r/min 离心 1min。
16. 含有病毒的上清液－80℃保存。

病毒可以通过一次和二次传代进行扩增。但是因为大多数病毒构建物的不稳定性，在后继的实验中，最好使用最早的传代病毒，并且经常通过 RNA 转染得到新的病毒，而不是传代得到新病毒。使用寡核苷酸引物利用反转录 PCR 技术扩增插入片段，可以监测病毒构建物的稳定性。

## 参考文献


Alexander L., Lu H.H., and Wimmer E. 1994. Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: Genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 1406–1410.

Andino R., Silvera D., Suggett S.D., Achacoso P.L., Miller C.J., Baltimore D., and Feinberg M.B. 1994. Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* **265:** 1448–1451.

Choi W.S., Pal-Gosh R.S., and Morrow C.D. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag, Pol, and Env proteins from chimeric HIV-1 poliovirus minireplicons. *J. Virol.* **65:** 2875–2883.

Crotty S. and Andino R. 2004. Poliovirus vaccine strains as mucosal vaccine vectors and their potential use to develop an AIDS vaccine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56:** 835–852.

Dobrikova E.Y., Florez P., and Gromeier M. 2003. Structural determinants of insert retention of poliovirus expression vectors with recombinant IRES elements. *Virology* **311:** 241–253.

Johansen L.K. and Morrow C.D. 2000. Inherent instability of poliovirus genomes containing two internal ribosome entry site (IRES) elements supports a role for the IRES in encapsidation. *J. Virol.* **74:** 8335–8342.

Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., and Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285:** 110–113.

Mandl S., Sigal L.J., Rock K.L., and Andino R. 1998. Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 8216–8221.

Mattion N.M., Reilly P.A., DiMichele S.J., Crowley J.C., and Weeks-Levy C. 1994. Attenuated poliovirus strain as a live vector: Expression of regions of rotavirus outer capsid protein VP7 by using recombinant Sabin 3 viruses. *J. Virol.* **68:** 3925–3933.

McKnight K.L. and Lemon S.M. 1996. Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. *J. Virol.* **70:** 1941–1952.

Molla A., Jang S.K., Paul A.V., Reuer Q., and Wimmer E. 1992. Cardioviral internal ribosomal entry site is functional in a genetically engineered dicistronic poliovirus. *Nature* **356:** 255–257.

Mueller S. and Wimmer E. 1998. Expression of foreign proteins by poliovirus polyprotein fusion: Analysis of genetic stability reveals rapid deletions and formation of cardioviruslike open reading frames. *J. Virol.* **72:** 20–31.

———. 2000. Picornaviruses as tools for antigen delivery. In *Viral vectors: Basic science and gene therapy* (ed. A. Cid-Arregui and A. García-Carrancá), pp. 543–562. Eaton Publishing, Natick, Massachusetts.

Mueller S., Wimmer E., and Cello J. 2005. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* **111:** 175–193.

Paul A.V., Mugavero J.A., Molla A., and Wimmer E. 1998. Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: Implications for proteolytic processing. *Virology* **250:** 241–253.

Percy N., Barclay W.S., Sullivan M., and Almond J.W. 1992. A poliovirus replicon containing the chloramphenicol acetyltransferase gene can be used to study the replication and encapsidation of poliovirus RNA. *J. Virol.* **66:** 5040–5046.

Porter D.C., Ansardi D.C., Choi W.S., and Morrow C.D. 1993.

Encapsidation of genetically engineered poliovirus minireplicons which express human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol proteins upon infection. *J. Virol.* **67:** 3712–3719.
Tang S., van Rij R., Silvera D., and Andino R. 1997. Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: Correlation between genetic stability and immunogenicity. *J. Virol.* **71:** 7841–7850.
Wimmer E., Hellen C.U., and Cao X. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27:** 353–436.
Zhao W.D. and Wimmer E. 2001. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: New structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* **75:** 3719–3730.
Zhao W.D., Wimmer E., and Lahser F.C. 1999. Poliovirus/hepatitis C virus (internal ribosomal entry site-core) chimeric viruses: Improved growth properties through modification of a proteolytic cleavage site and requirement for core RNA sequences but not for core related polypeptides. *J. Virol.* **73:** 1546–1554.

# 第三十三章　流感病毒的反向遗传学

Glenn A. Marsh 和 Peter Palese

Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029

张洪杰　译



## 摘要

因为流感病毒 A 感染人类和实验动物都会引起持续而强烈的细胞和体液免疫应答，所以被认为具有很好的做病毒载体的潜质。此外，流感病毒 A 已被用于传递外来抗原，激活机体对于这些抗原的免疫应答。利用流感病毒 A 做载体可以采用反向遗传技术直接对病毒基因组进行遗传操作。本章主要描述那些用于从 cDNA 克隆中恢复出具感染能力的流感病毒的方法。这些技术广泛地应用于外源基因的整合和表达、候选疫苗的研制和流感病毒复制的研究。使用流感病毒作为抗原传送载体的一个优点就是有一个巨大的不同抗原的病毒库。这就意味着以前存在的对一种病毒株的免疫不会妨碍使用另一种不同抗原的病毒株。

## 引言

流感病毒 A 是正黏病毒家族的典型成员，它的基因组由 8 条单链反义 RNA 片段组成，共编码 11 个蛋白质，是一种包膜病毒。病毒基因组的复制和转录都在宿主细胞的细胞核内进行。病毒核糖核酸蛋白（vRNP）复合物包含三种病毒编码的聚合酶蛋白 PB1、PB2 和 PA，还有核酸蛋白 NP，在流感病毒复制周期中执行很多功能。

因为要产生具有精确的 3′端和 5′端的 8 条不同的病毒 RNA 片段，所以通过反向遗传获得流感病毒比起其他负义链病毒来说要复杂得多。另外，因为病毒 RNA 的复制和转录都在宿主细胞的细胞核内进行，RNA 必须传送到细胞核或者直接在细胞核内产生。最初的实验引入了在体外重建功能 RNP 复合物并由此产生了对流感病毒的遗传工程操作（Honda et al. 1987；Szewczyk et al. 1988；Kobayashi et al. 1992）。使用提纯的聚合酶蛋白，在体外合成小 RNA（Parvin et al. 1989；Kobayashi et al. 1992）和全长 vRNA（Honda et al. 1990）的实验证明有效地进行 RNA 转录最少需要 4 种流感病毒蛋白 PB1、PB2、PA 和 NP。

进一步的研究证实功能 RNP 可以转染入细胞。类病毒 RNA 可以从包含其 cDNA 克隆的质粒中获得，在质粒中 cDNA 的两侧分别是一个 T7 启动子和一个从丁型肝炎病毒 RNA 中获得的自我剪切序列。RNA 与提纯的病毒 NP、聚合酶蛋白混合在一起对细胞进行转染。在转染之前或之后还需加入辅助病毒以合成其余的 vRNP（Luytjes et al. 1989；Enami et al. 1990；Enami and Palese 1991；Martin et al. 1992；Li et al. 1995）。这就需要从辅助病毒中筛选新病毒以获得包含有从 cDNA 中获得的 RNA（重组成功）的具感染性的病毒。还有一种方法，采用在流感病毒基因组片段的 3′和 5′非编码区内插入目的片段构建的质粒来转染细胞。由 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子序列来指导质粒转录，产生负的正义链 RNA。在细胞 RNA 聚合酶 I 的催化下从质粒中合成 vRNA 和病毒聚合酶蛋白，其余的基因组片段可以通过感染辅助病毒来提供（Neumann et al. 1994；Pleschka et al. 1996）。但是这些早期的系统对辅助病毒的依赖是一种缺陷，因为最后还要将其筛选出来，以鉴定和提纯那些改造的病毒株。

最早的流感病毒反向遗传系统被提出 10 年后，完全从克隆 cDNA 中获取流感病毒成为了可能（Fodor et al. 1999；Neumann et al. 1999）。在这个系统中，8 个基因组片段的每一个的 cDNA 都反向插入在一个人类 RNA 聚合酶 I 启动子和一个丁型肝炎病毒核酶序列之间（Fodor et al. 1999）。将 8 个编码 vRNA 的质粒和 4 个表达聚合酶 PB1、PB2、PA 和 NP 的质粒转染入非洲绿猴肾细胞（Vero cell）中，可以产生有感染性的病毒（图 1）。在

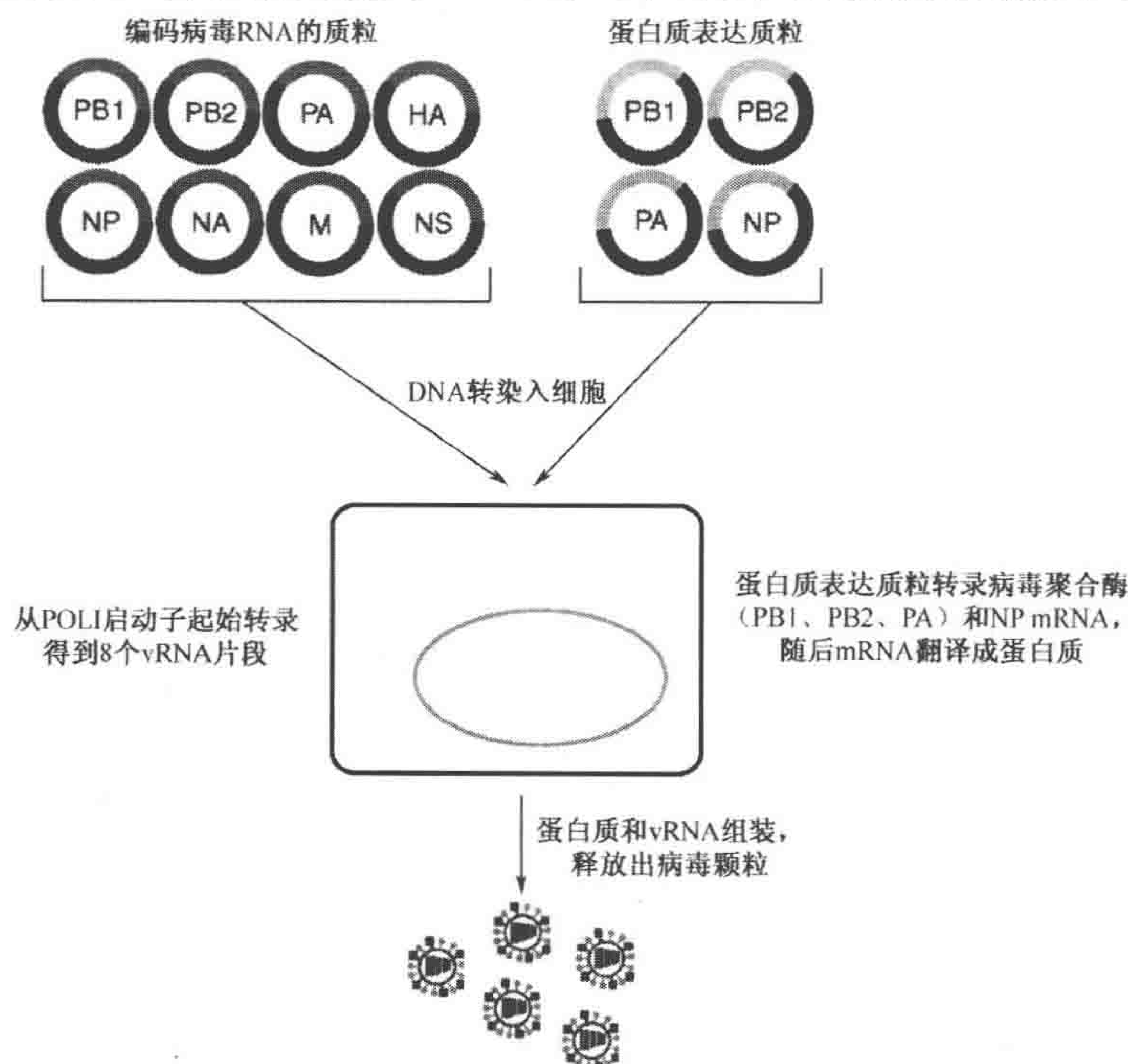



图 1. 完全从 cDNA 克隆中获得流感病毒的典型示意图。在 RNA 聚合酶 I 的控制下编码全部 8 个 vRNA 片段的质粒对细胞进行共转染。细胞 RNA 聚合酶 I 合成 vRNA，另外 4 个蛋白质表达质粒可以编码病毒聚合酶和 NP 蛋白进行 vRNA 的复制和转录。

这个过程中重组病毒的产生不依赖于协助病毒，所以就可以省略掉繁重的筛选工作。对这个系统的改进包括对共培养的293T细胞（因为人类RNA聚合酶启动子，还需要一个人类细胞系）的转染和对犬肾细胞（Madin-Darby canine kidney，MDCK）的转染。

对这个系统更进一步的改进也有报道，只需要8个质粒（Hoffmann et al. 2000a，b）。质粒中包含反向插入的病毒基因组片段cDNA，质粒的5′端是一个人类RNA聚合酶I启动子，3′端是一个老鼠RNA聚合酶I终止子。RNA聚合酶I终止子下游是一个细胞巨化病毒立即早期启动子。在另一端插入一个多腺苷酸序列可以增强聚合酶II进行的mRNA转录。细胞RNA聚合酶I可以将cDNA转录为vRNA。然后表达的病毒蛋白质和vRNA组装，出泡产生单纯质粒获得型具感染性病毒。更进一步将8个表达vRNA的质粒整合到一个质粒中，对不易转染的细胞的转染效率会有所提高（Neumann et al. 2005）。

流感病毒被用来表达外源基因，将外来抗原呈递给免疫系统。应用流感病毒成功表达外来抗原有好几种方法（Garcia-Sastre 2000）。举例来说，流感病毒的红血球凝集素和神经氨酸苷酶糖蛋白等抗原结构域可以替换为外源蛋白质的抗原决定簇。流感病毒表面糖蛋白的外结构域同样也可以替换外源糖蛋白。病毒基因组片段经过改进可以表达流感病毒蛋白和外源蛋白质融合而成的多蛋白质。这些融合蛋白质又可以被切成两个蛋白质。还可以通过添加编码外来抗原的第9个基因组片段产生所需病毒。最后，还可以在病毒mRNA中添加一个IRES（internal ribosomal entry site）使得流感病毒表达外来抗原。

相对于其他表达外源蛋白质的病毒系统来说，流感病毒表现出一系列的优越性。流感病毒不用整合入宿主基因组，也没有致癌基因。流感病毒的感染可以激发强烈而持久的免疫应答。另外，由于有一个巨大的不同抗原的病毒库，以前存在的对一种病毒株的免疫不会妨碍使用另一种不同抗原的病毒株。流感病毒有很多不同减毒株，应用反向遗传可以产生在减毒和抗原性上获得很好平衡的病毒载体。但是，流感病毒装载外源基因的能力是有限的，而且需要来自vRNA 3′和5′两端的组装信号。实际上，在基因组RNA的3′端和5′端编码区的红血球凝集素（Watanabe et al. 2002）、神经氨酸苷酶（Fujii et al. 2003）、非结构区（Fujii et al. 2005）和聚合酶（Liang et al. 2005）片段都在vRNA片段包装形成新的组装病毒颗粒的过程中起协助作用。

## 方案

# 应用反向遗传学获得流感病毒

### 材料

#### 试剂

牛血清白蛋白

细胞

239T细胞（ATCC，CRL-11268）

犬肾细胞（MDCK，ATCC，CCL-34）

在转染前，细胞应该在 75cm² 细胞培养瓶中生长到汇合。

DMEM

胎牛血清（FCS）

Lipofectamine 2000 试剂（Invitrogen 11668-027）

Opti-MEM I 低血清培养基（GIBCO 31985）

磷酸盐缓冲液（PBS）

质粒（0.5μg/μl），转染纯度

蛋白质表达载体

为以下每一个蛋白质准备一个单独的载体：PA、PB1、PB2、NP。

RNA 表达载体

为以下每一个流感病毒片段准备一个单独的载体：vRNA HA、M、NA、NP、NS、PA、PB1、PB2。

TPCK-胰岛素（Sigma-Aldrich T-8802）

## 仪器

细胞培养皿（35mm²）

细胞培养瓶（75cm²）

培养箱（37℃，5% $CO_2$）

6 孔细胞培养板

## 方法

1. 将 8 种 RNA 表达质粒和 4 种蛋白质表达质粒各 0.5μg 混合。室温下，使用 Opti-MEM 培养基稀释到最终量为 100μl。
2. 在第二个管中加入 6μl Lipofectamine 和 94μl Opti-MEM 培养基。混合好，室温孵育 5min。
3. 在 DNA 混合液（步骤 1）中加入 100μl 转染试剂主混合液（步骤 2）。轻敲小管混匀。室温孵育 20min。
4. 胰蛋白酶处理汇合的 239T 和 MDCK 细胞。分离的细胞在 10ml 室温 DMEM［含 10%FCS（不含抗生素）］中重悬。
5. 300*g* 左右离心 5min。10ml 室温 DMEM［含 10%FCS（不含抗生素）］中重悬。
6. 1∶1 混合 293T 和 MDCK 细胞。每 35mm² 平皿加入 10ml 混合细胞。
7. 在平皿中加入 DNA/Lipofectamine 混合液。晃动平皿使其混匀，使细胞分布均匀。37℃培养 6～24h。
8. 培养基换为 Opti-MEM（含 0.01% FCS，0.3% BSA 和 1μg/ml 的 TPCK-胰岛素）。继续培养。
9. 病毒转染前一天（如大概 24h 的后转染期），将 MDCK 接种在 6 孔细胞培养板上。37℃培养。

10. 48h 后传染，收集浮在表面的转染混合细胞，7000$g$ 离心取上清。

11. 移除 6 孔培养板培养 MDCK 细胞中的培养基。

    MDCK 细胞在转染时应该达到 80%～90%的汇合度（48h 后传染）。

12. PBS 洗细胞两次。加入步骤 10 获得的上清 200μl。37℃振荡培养 1h。

13. 加入 2ml Opti-MEM（含 0.01% FCS，0.3% BSA 和 1μg/ml 的 TPCK 胰岛素）。37℃，5% $CO_2$ 培养箱培养。

14. 每天检查由转染上清液感染的细胞，包括其 CPE 的出现和 HA 在培养上清液中的含量变化。

## 参考文献


Enami M. and Palese P. 1991. High-efficiency formation of influenza virus transfectants. *J. Virol.* **65:** 2711–2713.

Enami M., Luytjes W., Krystal M., and Palese P. 1990. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87:** 3802–3805.

Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G., Palese P., Brownlee G.G., and García-Sastre A. 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.* **73:** 9679–9682.

Fujii K., Fujii Y., Noda T., Muramoto Y., Watanabe T., Takada A., Goto H., Horimoto T., and Kawaoka Y. 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J. Virol.* **79:** 3766–3774.

Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., and Kawaoka Y. 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 2002–2007.

García-Sastre A. 2000. Transfectant influenza viruses as antigen delivery vectors. *Adv. Virus Res.* **55:** 579–597.

Hoffmann E., Neumann G., Hobom G., Webster R.G., and Kawaoka Y. 2000a. "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology* **267:** 310–317.

Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., and Webster R.G. 2000b. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 6180–6113.

Honda A., Ueda K., Nagata K., and Ishihama A. 1987. Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J. Biochem.* **102:** 1241–1249.

Honda A., Mukaigawa J., Yokoiyama A., Kato A., Ueda S., Nagata K., Krystal M., Nayak D.P., and Ishihama A. 1990. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem.* **107:** 624–628.

Kobayashi M., Tuchiya K., Nagata K., and Ishihama A. 1992. Reconstitution of influenza virus RNA polymerase from three subunits expressed using recombinant baculovirus system. *Virus Res.* **22:** 235–245.

Li S., Xu M., and Coelingh K. 1995. Electroporation of influenza virus ribonucleoprotein complexes for rescue of the nucleoprotein and matrix genes. *Virus Res.* **37:** 153–161.

Liang Y., Hong Y., and Parslow T.G. 2005. *cis*-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J. Virol.* **79:** 10348–10355.

Luytjes W., Krystal M., Enami M., Parvin J.D., and Palese P. 1989. Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell.* **59:** 1107–1113.

Martin J., Albo C., Ortin J., Melero J.A., and Portela A. 1992. In vitro reconstitution of active influenza virus ribonucleoprotein complexes using viral proteins purified from insect cells. *J. Gen. Virol.* **73:** 1855–1859.

Neumann G., Zobel A., and Hobom G. 1994. RNA polymerase I mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* **202:** 477–479.

Neumann G., Fujii K., Kino Y., and Kawaoka Y. 2005. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 16825–16829.

Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D.R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., and Kawaoka Y. 1999. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 9345–9350.

Parvin J.D., Palese P., Honda A., Ishihama A., and Krystal M. 1989. Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. *J. Virol.* **63:** 5142–5152.

Pleschka S., Jaskunas S.R., Engelhardt O.G., Zurcher T., Palese P., and García-Sastre A. 1996. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J. Virol.* **70:** 4188–4192.

Szewczyk B., Laver W.G., and Summers D.F. 1988. Purification, thioredoxin renaturation, and reconstituted activity of the three subunits of the influenza A virus RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85:** 7907–7911.

Watanabe T., Watanabe S., Neumann G., Kida H., and Kawaoka Y. 2002. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* **76:** 767–773.

# 第二篇　非病毒技术和载体

# 第三十四章　关于基因传送的压缩和非压缩多聚体系统的概述

Dinesh B. Shenoy 和 Mansoor M. Amiji
Department of Pharmaceutical Sciences，School of Pharmacy，Northestern University，
Boston，Massachusetts 02115
曹磊和张洪杰　译



## 引言

随着人类基因组计划的完成，可用于控制和治疗很多目前没有有效疗法的疾病的遗传分子药物面临着广阔的发展前景（Collins and Mansoura 2001；Carroll 2003；Collins et al. 2003a，b）。基因治疗的发展有两个方向：第一个努力方向是基于将治疗性 DNA 引入到病毒基因组中，然后利用病毒现有的细胞机制进行基因治疗（Carter and Samulski 2000；Walther and Stein 2000；Loser et al. 2002；Davidson and Breakefield 2003）。另一个平行的发展方向是以多聚体为基础的治疗，当前主要的研究都是基于合成这种非病毒的载体（Lollo et al. 2000；Fenske et al. 2001；Godbey and Mikos 2001；Schatzlein 2001；Liu and Huang 2002）。

多聚体基因传送载体应该具有以下几个基本特征：①可特异性地作用于靶标组织和细胞，位点特异性的传送携带的遗传信息；②可防止被新陈代谢或免疫途径降解，保护遗传物质；③已被证实是安全的和最小毒性的；④可以适当的调节方式，在有限的一段时间内进行治疗性的基因表达。

从技术上讲，非病毒的手段相对直接，而且不会引起特异性的免疫应答。但是，同病毒载体一样，有效地传送和定位依旧是它所面临的问题。

自我组装合成 DNA 传送载体技术发展的原理基于功能多聚体。构建的这些多聚体可以用来执行一系列的生物学功能，包括将 DNA 包裹在离散的颗粒中，用一个亲水的多聚体外衣确保 DNA 的稳定性等。根据多聚体的性质和构建载体系统技术的不同，被包装的 DNA 可以是压缩的，也可以是非压缩的。

一个多聚体基因传送系统必须含有 3 个基本元件来成功实现其功能：①编码治疗性蛋白质的一段基因；②一个包装系统，保护基因在进入细胞并控制编码蛋白质表达的过

程中不被降解；③一套给药模式，如通过导管注射或者气溶胶的方式。一旦被靶标细胞吸收（主要为胞吞），载体系统必须释放遗传物质，并协助遗传物质转运到细胞核中以进行基因表达。在这整个过程中会遇到很多的障碍，既有组织水平的，又有细胞水平的。扫除这些障碍是进行有效的多聚体为基础的 DNA 治疗的主要任务。

## 压缩多聚体系统

DNA 压缩在许多不同的科学领域都已经成为一个重要的研究对象，因为 DNA 压缩是遗传信息在细胞内进行包装，并被保护起来的一个过程。压缩可以定义为 DNA 分子由大的蠕虫状无规卷曲变为紧密状态的过程中体积的减少，用溶剂和 DNA 体积比的比值表示(Bloomfield 1991)。在压缩的过程中，伸展的 DNA 链折叠成仅包含一到数个分子的紧密有序的颗粒。DNA 形成特征性的螺旋状压缩颗粒，其大小的改变量是惊人的。

压缩剂通常以以下一种方式工作：①降低 DNA 片段间的排斥作用［例如，中和磷酸电荷和（或）通过多价阳离子增加 DNA 表面附近的亲水性］；②降低 DNA 与溶剂之间的亲和作用［例如，加入乙醇，DNA 在乙醇中的溶解度更低；或者加入另一种多聚体，如聚乙二醇（PEG），排除体积］，多价阳离子还可以引起局部的 DNA 弯曲变形，协助 DNA 进行压缩（Bloomfield 1991）。

压缩多聚体系统主要利用了带负电荷的 DNA 和带正电荷的多聚体之间的静电作用。在水溶液中，压缩需要＋3 甚至更高的正电荷。少于 400 个碱基对的 DNA 片段不会压缩成有序而离散的颗粒。这样，每个碱基对间的净吸引作用似乎很小，至少需要几百个碱基对的分子内和分子间的相互作用才能构建稳定的压缩颗粒。DNA 和压缩多聚体相互作用构成的超分子结构实际上是一个由亲水多聚体链外壳包被的 DNA 疏水核心(由于多聚体的多聚阳离子中和了 DNA 上的阴离子)。

根据使用的压缩剂复合物可以分为多聚复合体（polyplex）(DNA 和阳离子多聚体形成的复合物）(De Smedt et al. 2000；Hagstrom 2000；Wagner 2004）和脂质复合体(lipoplex）（DNA 和阳离子脂质形成的复合物）（Audouy and Hoekstra 2001；Ogris and Wagner 2002；Zhdanov et al. 2002；Pedroso de Lima et al. 2003；Tranchant et al. 2004)。如果阳离子多聚体连接着一个脂质体，那么与 DNA 形成的复合体称为脂质多聚复合体（lipopolyplex）(Pampinella et al. 2000；Fenske et al. 2001；Tsai et al. 2002；Harvie et al. 2003)。总的来说，复合体必须维持一定的络合比和总体电荷密度，使得复合的 DNA 带有微弱的正电荷，协助其与细胞相互作用并进一步胞吞。表 1 是阳离子多聚体和阳离子脂质的详细列表。

**表 1. 基因转移中使用的压缩多聚体**

| 多聚体 | 参考文献 |
|---|---|
| 天然的 | |
| 多聚赖氨酸(poly-L-lysine) | Read et al. 1999；Wang et al. 2001 |
| 几丁聚糖/壳聚糖(chitosan) | Borchard(2001)；Liu et al. (2005) |
| 白明胶(gelatin) | Leong et al. (1998)；Fukunaka et al. (2002) |
| 精胺/亚精胺(spermine/spermidine) | Thomas et al. (1996) |
| 多聚鸟氨酸(poly-L-ornithine) | Brown et al. (2000) |

续表

| 多聚体 | 参考文献 |
| --- | --- |
| 合成的 | |
| 聚乙烯亚胺(polyethyleneimine) | Forrest et al. (2003) |
| 聚乙烯亚胺 磺酰脲(polyethyleneimine-*g*-PEG-RGD) | Kim et al. (2005) |
| 多聚 β 氨基酯(poly-β-amino esters) | Anderson et al. (2005) |
| 阳离子树枝状高分子(cationic dendrimer) | Bielinska et al. (1999); Vlasov et al. (2004); Zhang et al. (2005) |
| 阳离子脂质(cationic lipid) | Lam et al. (2004); Janat-Amsbury et al. (2005) |
| 多聚赖氨酸磺酰脲 poly(L-lysine)-g-sulfonylurea | Kang et al. (2005) |
| 叶酸 聚乙烯亚胺 多聚丙交酯[folate-polyethyleneimine-block-poly(L-lactide)][a] | Wang and Hsiue(2005) |
| 多聚二甲氨基乙酯 多聚丙烯酸树脂-PEG [poly(dimethylaminoethyl methacrylate)-poly(butylmethacrylate)-PEG] | Funhoff et al. (2005) |
| 多聚 *N*-异丙基丙烯酰胺[poly-(*N*-isopropyl acrylamide)] | Zhang et al. (2004) |
| 丙烯酸酯和异丁烯酸多聚体(acrylate and methacrylate polymer) | Fonseca et al. (1999); Cortesi et al. (2004) |
| 多聚氨基磷酸酯(polyphosphoramidate) | Wang et al. (2004) |
| 多聚氨乙基丙烯磷酸(polyaminoethyl propylene phosphate) | Li et al. (2004) |
| 精蛋白(protamine) | Dunne et al. (2003) |
| 聚偶磷氮(polyphosphazenes) | Luten et al. (2003) |
| 多聚氨基酯[poly(amino ester)] | Lim et al. (2002) |
| 半乳糖-PEG-聚乙烯亚胺(galactose-PEG-polyethyleneimine)[a] | Sagara and Kim(2002) |
| 叶酸-PEG-叶酸接枝聚乙烯亚胺(folate-PEG-folate-graft-polyethyleneimine)[a] | Benns et al. (2001) |
| 聚乙烯亚胺-*N*-2-氨基乙酯-乙烯亚胺-*N*-*N* 胆甾醇氧基甲酰基-2-氨基乙酰-乙烯亚胺{poly(ethyleneimine)-co-(*N*-[2-aminoethyl]ethyleneimine)-co-*N*-(*N*-cholesteryloxycarbonyl-[2-aminoethyl]ethyleneimine)} | Han et al. (2001) |
| 多聚 4 氨基丁基 乙二醇酸{poly[α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]} | Koh et al. (2000) |
| 阳离子多肽(cationic peptide) | Fominaya et al. (2000) |
| 1,4-二氢吡啶(1,4-dihydropyridne) | Hyvonen et al. (2000) |
| 乳糖-PEG-连枝多聚赖氨酸(lactose-PEG-grafted poly-L-lysine) | Choi et al. (1998) |
| 磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine) | Hope et al. (1998) |

[a] 杂交多功能多聚体。

一般，将 DNA 稀释液（微摩尔级单位）和阳离子多聚体温和搅拌混匀。多聚体保持过量，起到胶质稳定剂的作用，并且为系统提供总体的正电荷。纳米级的复合物离散颗粒迅速形成（图 1A）。聚合体可以加入一条亲水链，如 PEG，作为纳米颗粒的外壳，或者可以加入一个配体，形成纳米颗粒的晕，行使靶标定位功能（图 2）。这样的多功能共聚合体可以注入系统循环中，寻找靶标组织和靶标细胞，进行有效的转染，所以在 DNA 压缩系统的发展中这种方法越来越流行。

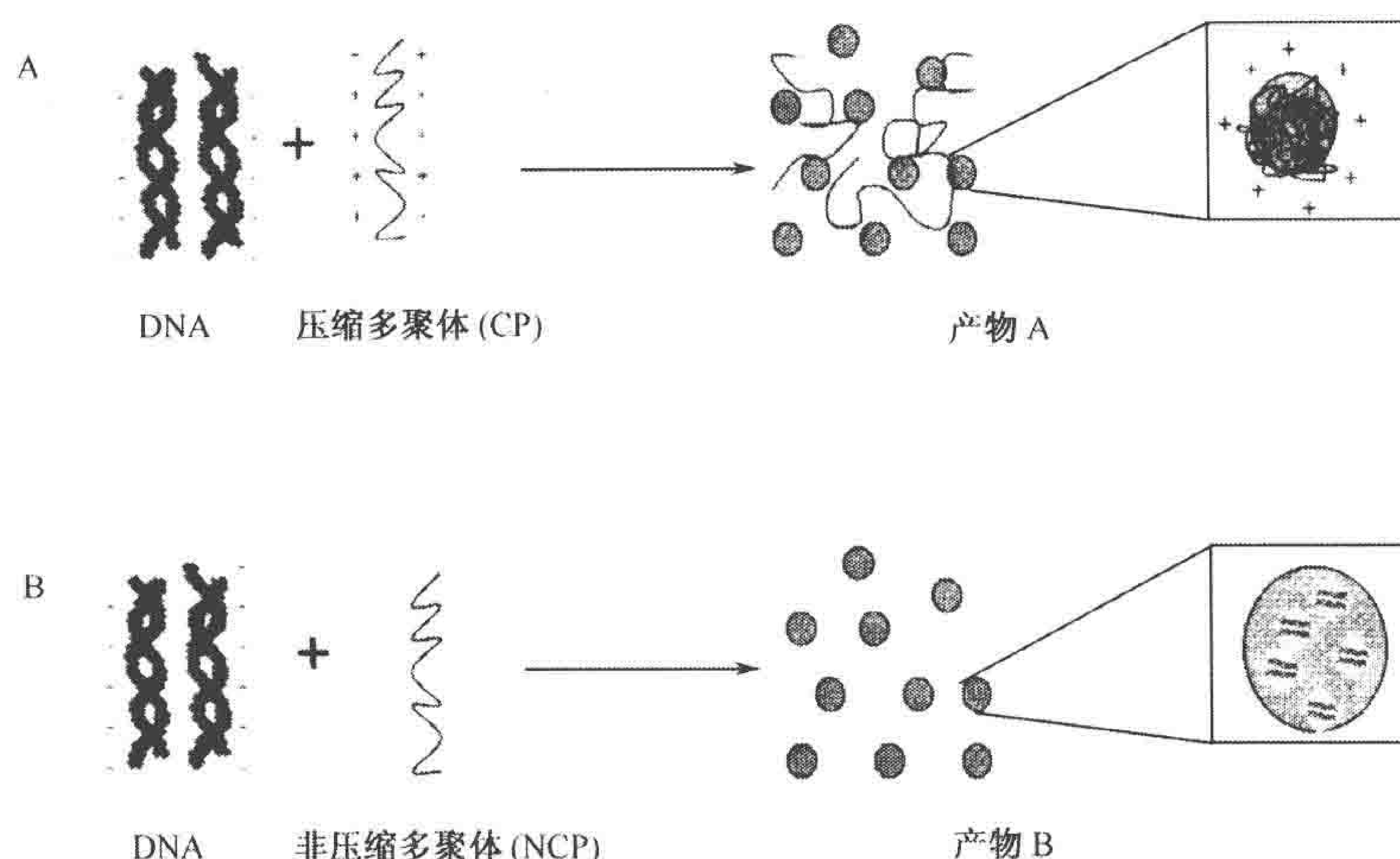



图1．压缩多聚体（CP）和非压缩多聚体（NCP）的基因传送系统示意图。A. 产物A主要是纳米颗粒复合物，过量的压缩多聚体行使阳离子胶质稳定剂的功能使得产物稳定。B. 多聚体将DNA包埋在微/纳米基质中形成B，产物B代表一个固体微/纳米颗粒，颗粒形成过程是在高机械力和压力的协助下进行的。

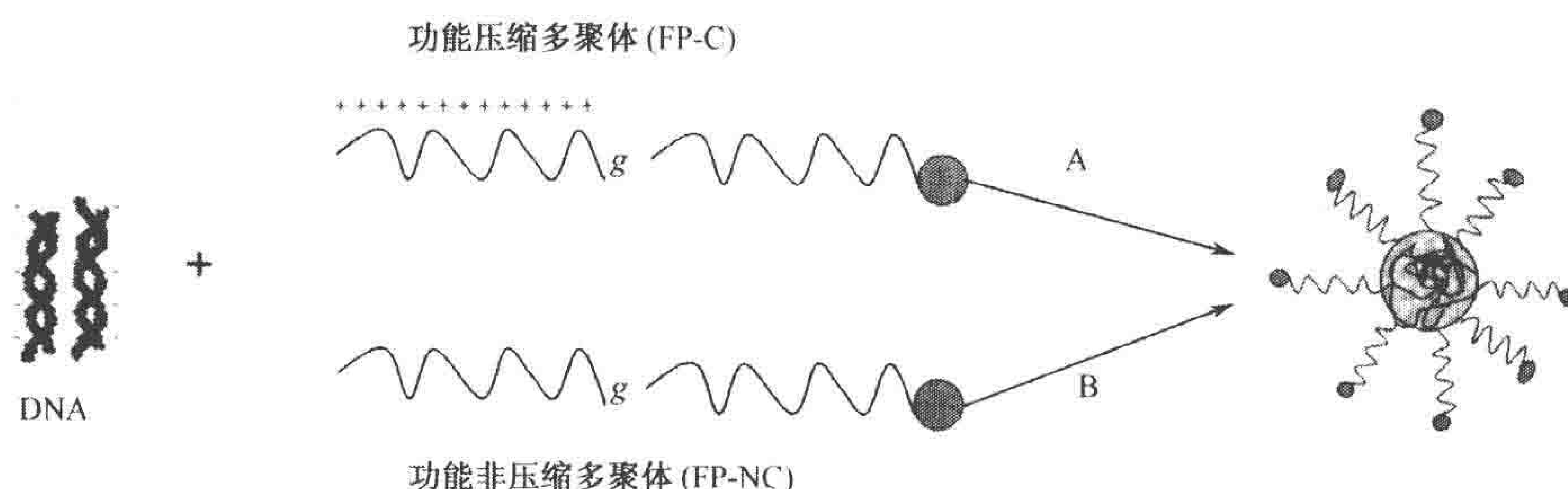



图2．构建功能压缩多聚体（FP-C）和功能非压缩多聚体（FP-NC）基因传送系统的示意图。每一个多聚体都有一个功能实体连接着一个亲水单体（如PEG）。另一个单体促进颗粒核心的形成（复合物的形式或母体的形式）。路径A实际上产生图1A描述的产物，一个纳米颗粒形式的复合物，共聚合单体使其稳定，并具有功能。路径B产生与图1B相似的产物，DNA固定在微纳米母体中。表面被共聚合单体稳定，并且具有功能。

从设计的角度来看，如何使DNA从一个压缩的多聚体中释放出来是一个有挑战性的问题，因为它的要求正好与包装时相反。在压缩多聚体为基础的基因传送系统中，从自组装的多聚阳离子/DNA复合物中释放出DNA是重要的一步，也是人们知之甚少的一步。这也促使人们设计新材料来有效平衡这两个对立标准。

## 非压缩多聚体系统

压缩多聚体与DNA形成自组装复合物，得到一个压缩的结构，而非压缩多聚体依赖物理作用力将DNA包裹入多聚体母体内（Lengsfeld et al. 2002；Otsuka et al. 2003；Ravi Kumar et al. 2004）。

设计原理是在DNA溶液中使多聚体沉淀下来（图2B）。可以通过降低多聚体的溶解度使其沉淀下来（改变溶剂或者加入另一种试剂发生凝聚）。利用高机械力（如Silverson高速搅拌器）或高压（如高压微射流纳米匀质机）协助形成颗粒以获得想要的大小。合成的产物为微/纳米胶囊（DNA填充的核心包被着多聚体形成的外壳）或微/纳米颗粒（DNA分散在多聚体母体中形成固态单块系统）。另外，有必要加入胶质稳定剂防止颗粒聚集。DNA和非压缩多聚体之间不发生分子水平的相互作用，这就导致其对DNA的诱捕效率要低于压缩多聚体。通过对多聚体的仔细筛选，这个问题可以解决。

这种包装系统的一大优点在于其可以控制DNA从多聚体母体系统中释放出来。固定在微/纳米母体中的DNA的释放取决于多聚体本身的物化性质（分子质量、溶解性、亲水性、pKa等）。如果多聚体是水溶性的（如很多自然多聚体），通过试剂或盐介导的凝聚形成颗粒。对于非水溶性多聚体（大多数合成多聚体），通过高机械力或高压方法辅助形成颗粒。

多聚体可以通过剪切来获得一个功能实体，如一个亲水链单体（如PEG；图2）在颗粒表面形成一个屏障来抵御系统循环中的网状内皮系统进行的早熟切割。另外，还可以在颗粒上连接配体引导其在循环中定位到特异性组织和细胞中并促进细胞有效吸收。

## 杂合多聚体

功能多聚体化学的发展使得生物多聚体可以含有多个单体，每一种单体都可以给DNA传送系统加一些独特的属性。一个多聚体可以加入一种单体与DNA形成复合物，另一种单体可以形成微/纳米颗粒母体，还可以加入第三种单体使颗粒变得更为隐秘（通过一个亲水外衣使其不易被网状内皮组织识别），第四种单体可以使其具有靶标特异性（杂合多聚体见表1和表2）。

**表2．基因转移中使用的非压缩多聚体**

| 多聚体 | 参考文献 |
| --- | --- |
| **天然的** | |
| 藻酸盐（alginate） | Aggarwal et al.(1999) |
| 白明胶（gelatin） | Kaul and Amiji (2005)；Zwiorek et al. (2005) |
| **合成的** | |
| 聚乳酸 羟基乙酸［poly(lactide-co-glycolide)］ | Cohen et al. (2000)；Laurencin et al. (2001)；Eliaz and Szoka (2002)；Dunne et al. (2003)；Chun et al. (2004)；Dawson et al. (2004)；Garcia del Barrio et al. (2004)；Khan et al. (2004)；Kofron and Laurencin (2004)；Oster et al. (2004) |
| 聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone） | Prokop et al. (2002) |
| 聚已酸内酯（polycaprolactone） | Shuai et al. (2005) |
| 多聚乳酸［poly (lactic acid)］ | Berton et al. (2001) |
| 聚乙烯醇［poly (vinyl alcohol)］ | Paradossi et al. (2003)；Oster et al. (2004) |
| 聚乳酸羟基脯氨酸［poly (D,L-lactide-co-4-hydroxy-L-proline)］ | Li and Huang (2004) |
| 聚甲基丙烯酸甲酯［poly (methyl methacrylate)］ | Caputo et al. (2004) |

续表

| 多聚体 | 参考文献 |
| --- | --- |
| 聚乙撑氧-聚环氧丙烷-聚乙撑氧［poly(ethylene oxide) -poly (propylene oxide) -poly (ethylene oxide)］ | Liaw et al. (2001); Chang et al. (2004) |
| 环式糊精 (cyclodextrin) | Davis et al. (2004) |
| 麦芽糊精 (maltodextrin) | Huang et al. (2002) |
| 聚4-氨基丁基-羟基乙酸｛poly［α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid］｝ | Lim et al. (2000) |
| 聚氰基丙烯酸异丁酯 (polyalkylcyanoacrylate) | Fattal et al. (1998) |

## 多聚体传送系统将基因导入细胞的全过程

大部分的DNA传送系统在三个水平实现其功能：DNA压缩/络合或诱捕进传送系统，系统被细胞内吞，寻找进入细胞核。

首先，与相应阳离子多聚体结合的压缩形式的DNA或者被非压缩多聚体包裹的DNA被细胞吸收，通常是内吞的形式。内吞是一个多步的过程，包括细胞壁吸附、内包、内体形成，以及与溶酶体融合和裂解。过低的pH和存在于内体和溶酶体中的酶往往会使DNA和传送系统发生降解。最后，在进入细胞核之前或之后，在内吞过程和细胞质核酸酶的裂解中幸存下来的DNA从传送系统中释放出来。一般认为进入核的过程发生在核孔（直径10nm左右）处或细胞分裂的过程中。在胞质体传输的全部过程中，细胞核吸收DNA属于限速步骤。一旦进入细胞核，传送DNA的转染效率就主要依赖于基因表达系统的组成了。

载体与内体/胞质体组件的相互作用主要取决于纳米载体组成材料的化学性质。所以，设计的多聚体必须使得包被其中的DNA在细胞内的相互作用下保持稳定并能被细胞核有效吸收。

## 应用

在过去的20年中应用于药物传送的生物多聚体的研究领域特别火爆。而与此同时，由于在如何安全可靠地将治疗性遗传物质传送到机体的特定部位这个问题上遇到了一些困难，疾病的基因治疗屡屡受挫。例如，临床实验中数名患者的死亡导致了反转录病毒停止应用于遗传物质传送。但是，在纳米技术和多聚体工程领域令人振奋的发展，以及人类基因组计划的成功完成都预示着作为治愈疾病的工具，基因治疗时代即将到来。

## 参考文献


Aggarwal N., HogenEsch H., Guo P., North A., Suckow M., and Mittal S.K. 1999. Biodegradable alginate microspheres as a delivery system for naked DNA. *Can. J. Vet. Res.* **63:** 148–152.

Anderson D.G., Akinc A., Hossain N., and Langer R. 2005. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β-amino esters). *Mol. Ther.* **11:** 426–434.

Audouy S. and Hoekstra D. 2001. Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review). *Mol. Membr. Biol.* **18:** 129–143.

Benns J.M., Maheshwari A., Furgeson D.Y., Mahato R.I., and Kim S.W. 2001. Folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine-based gene delivery. *J. Drug Target.* **9:** 123–139.

Berton M., Turelli P., Trono D., Stein C.A., Allemann E., and Gurny R. 2001. Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm. Res.* **18:** 1096–1101.

Bielinska A.U., Chen C., Johnson J., and Baker J.R., Jr. 1999. DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: Implications for transfection. *Bioconjug. Chem.* **10:** 843–850.

Bloomfield V.A. 1991. Condensation of DNA by multivalent cations: Considerations on mechanism. *Biopolymers* **31:** 1471–1481.

Borchard G. 2001. Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **52:** 145–150.

Brown M.D., Schatzlein A., Brownlie A., Jack V., Wang W., Tetley L., Gray A.I., and Uchegbu I.F. 2000. Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents. *Bioconjug. Chem.* **11:** 880–891.

Caputo A., Brocca-Cofano E., Castaldello A., De Michele R., Altavilla G., Marchisio M., Gavioli R., Rolen U., Chiarantini L., Cerasi A., Dominici S., Magnani M., Cafaro A., Sparnacci K., Laus M., Tondelli L., and Ensoli B. 2004. Novel biocompatible anionic polymeric microspheres for the delivery of the HIV-1 Tat protein for vaccine application. *Vaccine* **22:** 2910–2924.

Carroll S.B. 2003. Genetics and the making of *Homo sapiens. Nature* **422:** 849–857.

Carter P.J. and Samulski R.J. 2000. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int. J. Mol. Med.* **6:** 17–27.

Chang S.F., Chang H.Y., Tong Y.C., Chen S.H., Hsaio F.C., Lu S.C., and Liaw J. 2004. Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* **15:** 481–493.

Choi Y.H., Liu F., Park J.S., and Kim S.W. 1998. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug. Chem.* **9:** 708–718.

Chun K.W., Cho K.C., Kim S.H., Jeong J.H., and Park T.G. 2004. Controlled release of plasmid DNA from biodegradable scaffolds fabricated using a thermally induced phase-separation method. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **15:** 1341–1353.

Cohen H., Levy R.J., Gao J., Fishbein I., Kousaev V., Sosnowski S., Slomkowski S., and Golomb G. 2000. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* **7:** 1896–1905.

Collins F.S. and Mansoura M.K. 2001. The Human Genome Project. Revealing the shared inheritance of all humankind. *Cancer* **91:** 221–225.

Collins F.S., Morgan M., and Patrinos A. 2003a. The Human Genome Project: Lessons from large-scale biology. *Science* **300:** 286–290.

Collins F.S., Green E.D., Guttmacher A.E., and Guyer M.S. 2003b. A vision for the future of genomics research. *Nature* **422:** 835–847.

Cortesi R., Mischiati C., Borgatti M., Breda L., Romanelli A., Saviano M., Pedone C., Gambari R., and Nastruzzi C. 2004. Formulations for natural and peptide nucleic acids based on cationic polymeric submicron particles. *AAPS PharmSci.* **6:** E2.

Davidson B.L. and Breakefield X.O. 2003. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **4:** 353–364.

Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., and Heidel J.D. 2004. Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers. *Curr. Med. Chem.* **11:** 179–197.

Dawson M., Krauland E., Wirtz D., and Hanes J. 2004. Transport of polymeric nanoparticle gene carriers in gastric mucus. *Biotechnol. Prog.* **20:** 851–857.

De Smedt S.C., Demeester J., and Hennink W.E. 2000. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **17:** 113–126.

Dunne M., Bibby D.C., Jones J.C., and Cudmore S. 2003. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *J. Control. Release* **92:** 209–219.

Eliaz R.E. and Szoka F.C., Jr. 2002. Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. *Gene Ther.* **9:** 1230–1237.

Fattal E., Vauthier C., Aynie I., Nakada Y., Lambert G., Malvy C., and Couvreur P. 1998. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J. Control. Release* **53:** 137–143.

Fenske D.B., MacLachlan I., and Cullis P.R. 2001. Long-circulating vectors for the systemic delivery of genes. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3:** 153–158.

Fominaya J., Gasset M., Garcia R., Roncal F., Albar J.P., and Bernad A. 2000. An optimized amphiphilic cationic peptide as an efficient non-viral gene delivery vector. *J. Gene Med.* **2:** 455–464.

Fonseca M.J., Storm G., Hennink W.E., Gerritsen W.R., and Haisma H.J. 1999. Cationic polymeric gene delivery of beta-glucuronidase for doxorubicin prodrug therapy. *J. Gene Med.* **1:** 407–414.

Forrest M.L., Koerber J.T., and Pack D.W. 2003. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **14:** 934–940.

Fukunaka Y., Iwanaga K., Morimoto K., Kakemi M., and Tabata Y. 2002. Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J. Control. Release* **80:** 333–343.

Funhoff A.M., Monge S., Teeuwen R., Koning G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., Crommelin D.J., Haddleton D.M., Hennink W.E., and van Nostrum C.F. 2005. PEG shielded polymeric double-layered micelles for gene delivery. *J. Control. Release* **102:** 711–724.

Garcia del Barrio G., Hendry J., Renedo M.J., Irache J.M., and Novo F.J. 2004. In vivo sustained release of adenoviral vectors from poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microparticles prepared by TROMS. *J. Control. Release* **94:** 229–235.

Godbey W.T. and Mikos A.G. 2001. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J. Control. Release* **72:** 115–125.

Hagstrom J.E. 2000. Self-assembling complexes for in vivo gene delivery. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2:** 143–149.

Han S., Mahato R.I., and Kim S.W. 2001. Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **12:** 337–345.

Harvie P., Dutzar B., Galbraith T., Cudmore S., O'Mahony D., Anklesaria P., and Paul R. 2003. Targeting of lipid-protamine-DNA (LPD) lipopolyplexes using RGD motifs. *J. Liposome Res.* **13:** 231–247.

Hope M.J., Mui B., Ansell S., and Ahkong Q.F. 1998. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (review). *Mol. Membr. Biol.* **15:** 1–14.

Huang C.Y., Ma S.S., Lee S., Radhakrishnan R., Braun C.S., Choosakoonkriang S., Wiethoff C.M., Lobo B.A., and Middaugh C.R. 2002. Enhancements in gene expression by the choice of plasmid DNA formulations containing neutral polymeric excipients. *J. Pharm. Sci.* **91:** 1371–1381.

Hyvonen Z., Plotniece A., Reine I., Chekavichus B., Duburs G., and Urtti A. 2000. Novel cationic amphiphilic 1,4-dihydropyridine derivatives for DNA delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1509:** 451–466.

Janat-Amsbury M.M., Yockman J.W., Lee M., Kern S., Furgeson D.Y., Bikram M., and Kim S.W. 2005. Local, non-viral IL-12 gene therapy using a water soluble lipopolymer as carrier system combined with systemic paclitaxel for cancer treatment. *J. Control. Release* **101:** 273–285.

Kang H.C., Kim S., Lee M., and Bae Y.H. 2005. Polymeric gene carrier for insulin secreting cells: Poly(L-lysine)-*g*-sulfonylurea for receptor mediated transfection. *J. Control. Release* **105:** 164–176.

Kaul G. and Amiji M. 2005. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: In vitro and in vivo studies. *Pharm. Res.* **22:** 951–961.

Khan A., Benboubetra M., Sayyed P.Z., Ng K.W., Fox S., Beck G., Benter I.F., and Akhtar S. 2004. Sustained polymeric delivery of gene silencing antisense ODNs, siRNA, DNAzymes and ribozymes: In vitro and in vivo studies. *J. Drug Target.* **12:** 393–404.

Kim W.J., Yockman J.W., Lee M., Jeong J.H., Kim Y.H., and Kim S.W. 2005. Soluble *Flt-1* gene delivery using PEI-g-PEG-RGD conjugate for anti-angiogenesis. *J. Control. Release* **106:** 224–234.

Kofron M.D. and Laurencin C.T. 2004. Development of a calcium phosphate coprecipitate/poly(lactide-co-glycolide) DNA delivery system: Release kinetics and cellular transfection studies. *Biomaterials* **25:** 2637–2643.

Koh J.J., Ko K.S., Lee M., Han S., Park J.S., and Kim S.W. 2000. Degradable polymeric carrier for the delivery of IL-10 plasmid DNA to prevent autoimmune insulitis of NOD mice. *Gene Ther.* **7:** 2099–2104.

Lam J.K., Ma Y., Armes S.P., Lewis A.L., Baldwin T., and Stolnik S. 2004. Phosphorylcholine-polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery. *J. Control. Release* **100:** 293–312.

Laurencin C.T., Attawia M.A., Lu L.Q., Borden M.D., Lu H.H., Gorum W.J., and Lieberman J.R. 2001. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: A regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials* **22:** 1271–1277.

Lengsfeld C.S., Manning M.C., and Randolph T.W. 2002. Encapsulating DNA within biodegradable polymeric microparticles. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3:** 227–235.

Leong K.W., Mao H.Q., Truong-Le V.L., Roy K., Walsh S.M., and August J.T. 1998. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Release* **53:** 183–193.

Li Y., Wang J., Lee C.G., Wang C.Y., Gao S.J., Tang G.P., Ma Y.X., Yu H., Mao H.Q., Leong K.W., and Wang S. 2004. CNS gene transfer mediated by a novel controlled release system based on DNA complexes of degradable polycation PPE-EA: A comparison with polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther.* **11:** 109–114.

Li Z. and Huang L. 2004. Sustained delivery and expression of plasmid DNA based on biodegradable polyester, poly(D,L-lactide-co-4-hydroxy-L-proline). *J. Control. Release* **98:** 437–446.

Liaw J., Chang S.F., and Hsiao F.C. 2001. In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther.* **8:** 999–1004.

Lim Y.B., Kim S.M., Suh H., and Park J.S. 2002. Biodegradable, endosome disruptive, and cationic network-type polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier. *Bioconjug. Chem.* **13:** 952–957.

Lim Y.B., Han S.O., Kong H.U., Lee Y., Park J.S., Jeong B., and Kim S.W. 2000. Biodegradable polyester, poly[α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm. Res.* **17:** 811–816.

Liu F. and Huang L. 2002. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control. Release* **78:** 259–266.

Liu W., Sun S., Cao Z., Zhang X., Yao K., Lu W.W., and Luk K.D. 2005. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials* **26:** 2705–2711.

Lollo C.P., Banaszczyk M.G., and Chiou H.C. 2000. Obstacles and advances in non-viral gene delivery. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2:** 136–142.

Loser P., Huser A., Hillgenberg M., Kumin D., Both G.W., and Hofmann C. 2002. Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther.* **2:** 161–171.

Luten J., van Steenis J.H., van Someren R., Kemmink J., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., Koning G.A., Crommelin D.J., van Nostrum C.F., and Hennink W.E. 2003. Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery. *J. Control. Release* **89:** 483–497.

Ogris M. and Wagner E. 2002. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **27:** 85–95.

Oster C.G., Wittmar M., Unger F., Barbu-Tudoran L., Schaper A.K., and Kissel T. 2004. Design of amine-modified graft polyesters for effective gene delivery using DNA-loaded nanoparticles. *Pharm. Res.* **21:** 927–931.

Otsuka H., Nagasaki Y., and Kataoka K. 2003. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55:** 403–419.

Pampinella F., Pozzobon M., Zanetti E., Gamba P.G., McLachlan I., Cantini M., and Vitiello L. 2000. Gene transfer in skeletal muscle by systemic injection of DODAC lipopolyplexes. *Neurol. Sci.* **21:** S967–969.

Paradossi G., Cavalieri F., Chiessi E., Spagnoli C., and Cowman M.K. 2003. Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14:** 687–691.

Pedroso de Lima M.C., Neves S., Filipe A., Duzgunes N., and Simoes S. 2003. Cationic liposomes for gene delivery: From biophysics to biological applications. *Curr. Med. Chem.* **10:** 1221–1231.

Prokop A., Kozlov E., Moore W., and Davidson J.M. 2002. Maximizing the in vivo efficiency of gene transfer by means of nonviral polymeric gene delivery vehicles. *J. Pharm. Sci.* **91:** 67–76.

Ravi Kumar M., Hellermann G., Lockey R.F., and Mohapatra S.S. 2004. Nanoparticle-mediated gene delivery: State of the art. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4:** 1213–1224.

Read M.L., Etrych T., Ulbrich K., and Seymour L.W. 1999. Characterisation of the binding interaction between poly(L-lysine) and DNA using the fluorescamine assay in the preparation of non-viral gene delivery vectors. *FEBS Lett.* **461:** 96–100.

Sagara K. and Kim S.W. 2002. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J. Control. Release* **79:** 271–281.

Schatzlein A.G. 2001. Non-viral vectors in cancer gene therapy: Principles and progress. *Anti-cancer Drugs* **12:** 275–304.

Shuai X., Merdan T., Unger F., and Kissel T. 2005. Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility. *Bioconjug. Chem.* **16:** 322–329.

Thomas T.J., Kulkarni G.D., Greenfield N.J., Shirahata A., and Thomas T. 1996. Structural specificity effects of trivalent polyamine analogues on the stabilization and conformational plasticity of triplex DNA. *Biochem. J.* **319:** 591–599.

Tranchant I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., and Scherman D. 2004. Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J. Gene Med.* (suppl. 1) **6:** S24–35.

Tsai J.T., Furstoss K.J., Michnick T., Sloane D.L., and Paul R.W. 2002. Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36:** 13–20.

Vlasov G.P., Korol'kov V.I., Pankova G.A., Tarasenko I.I., Baranov A.N., Glazkov P.B., Kiselev A.V., Ostapenko O.V., Lesina E.A., and Baranov V.S. 2004. Dendrimers based lysine and their "starburst" polymeric derivatives: Prospects of use in compacting DNA and in vitro delivery of genetic constructs (in Russian). *Bioorg. Khim.* **30:** 15–24.

Wagner E. 2004. Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: Will "artificial viruses" be the answer? *Pharm. Res.* **21:** 8–14.

Walther W. and Stein U. 2000. Viral vectors for gene transfer: A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* **60:** 249–271.

Wang C.H. and Hsiue G.H. 2005. Polymer-DNA hybrid nanoparticles based on folate-polyethylenimine-block-poly(L-lactide). *Bioconjug. Chem.* **16:** 391–396.

Wang J., Gao S.J., Zhang P.C., Wang S., Mao H.Q., and Leong K.W. 2004. Polyphosphoramidate gene carriers: Effect of charge group on gene transfer efficiency. *Gene Ther.* **11:** 1001–1010.

Wang W., Tetley L., and Uchegbu I.F. 2001. The level of hydrophobic substitution and the molecular weight of amphiphilic poly-L-lysine-based polymers strongly affects their assembly into polymeric bilayer vesicles. *J. Colloid Interface. Sci.* **237:** 200–207.

Zhang J.T., Huang S.W., and Zhuo R.X. 2004. Temperature-sensitive polyamidoamine dendrimer/poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels with improved responsive properties. *Macromol. Biosci.* **4:** 575–578.

Zhang X.Q., Wang X.L., Huang S.W., Zhuo R.X., Liu Z.L., Mao H.Q., and Leong K.W. 2005. In vitro gene delivery using polyamidoamine dendrimers with a trimesyl core. *Biomacromolecules* **6:** 341–350.

Zhdanov R.I., Podobed O.V., and Vlassov V.V. 2002. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* **58:** 53–64.

Zwiorek K., Kloeckner J., Wagner E., and Coester C. 2005. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7:** 22–28.

# 第三十五章　磷酸钙共沉淀质粒 DNA 转染海马神经元细胞

Bernhard Goetze 和 Michael Kiebler
Center for Brain Research，Medical University of Vienna，Department of Neuronal Cell Biology，1090 Vienna，Austria
王均　译



## 摘要

利用 DNA/磷酸钙（$CaPO_4$）共沉淀的方法来转染细胞是一个被广为描述的方法。虽然这种共沉淀法在 30 多年前就已经被提出了（Graham and van der Eb 1973），但至今实验室中仍在广泛应用，这主要是因为它相对于其他转染方法而言具有明显的优点。相对于商业化的转染试剂盒，这种方法所需要的试剂便宜，可以用于各种已建立的细胞系（包括贴壁和不贴壁细胞系）和原代细胞的转染试验，而且可以用于构建稳定转染的细胞系。这种方法一旦建立，下次使用就非常直接、方便。我们通过试验优化了两个用 DNA/磷酸钙共沉淀法转染细胞的关键参数，使该方法具有可靠的重复性和有效的转染效率。这两个参数是转染细胞培养基的精确 pH，以及细胞与 DNA/磷酸钙共沉淀物共同培养的时间。利用我们优化的方法转染细胞，不需要添加任何附加的细胞培养设备。我们发现这一技术对于原代海马神经元细胞的高效转染尤为有效，因此这里集中描述这一典型应用（Goetze et al. 2004）。

## 引言

利用 $CaPO_4$ 转染的基本原理最早是由 Graham 和 van der Eb 在 1973 年提出的。质粒 DNA 和磷酸钙混合形成 DNA/$CaPO_4$ 共沉淀物，将它加入到培养的细胞中，会通过内吞作用进入细胞。通过目前尚不明了的机制，DNA 从内含体逃逸到细胞质，随后进入细胞核，进入细胞核的过程可能是在细胞分裂时核被膜出现破裂时发生的。但是，神经元细胞属于分裂后细胞，它也可以用这种方法转染，表明 DNA 进入细胞核可能还存

在另外一种尚未被认识的路径。Ishiura 等（1982）成功地用这一方法将噬菌体颗粒转移到了细胞系中，我们在此基础上对这一方法进一步进行了优化，将准确测定 pH 的 BES 磷酸盐缓冲生理盐水（2×BBS）缓慢滴加到 DNA 和$CaCl_2$的混合溶液中，然后，迅速将混合液加入到待转染的细胞中，这样，DNA/$CaPO_4$ 的共沉淀物在转染培养基中形成，其粒径和密度随培养时间的增加而增加。根据实验设计，我们在 45min～6h 这段时间内将共沉淀物洗除。在开始培养 3h 之后，用荧光标记物跟踪报道基因的表达（Goetze et al. 2004）。沉淀物的生成主要依赖于 2×BBS 和转染培养基的 pH。与标准的碳酸盐缓冲培养基相反，我们在这里使用 pH 不依赖于 $CO_2$ 的 HEPES 缓冲转染培养基，并将其 pH 设定在 7.4，这也是神经元细胞生长的生理 pH（Goslin et al. 1998；Goetze et al. 2003）。固定 pH 可以保证沉淀以可控匀速的方式生成，从而提高转染效率并增强转染过程中的细胞存活率。针对不同的质粒，为了找到最优的转染条件，我们以 0.05 为变化单位，从 pH 6.80～7.30 配制了一系列不同 pH 的 2×BBS 缓冲溶液，研究转染条件和效率的关系。我们发现除了不同的质粒会造成共沉淀物生成的速率和粒径外，即便是同种质粒，不同的实验条件也会导致明显差别。因此，为了得到可重复的转染效率和结果，我们有必要优化实验条件，包括 2×BBS 缓冲液的 pH 以及使用不同质粒时的培养时间。实验中，我们发现转染培养基 pH 的变化对沉淀的生成及粒径大小起着至关重要的作用（表 1）。沉淀物的粒径是成功转染原代海马神经元细胞的关键参数，而我们的这个方法可以对它进行很好的调控。我们在此描述成功转染原代海马神经元细胞优化的实验条件，然而，这一方法也可用于成功转染原代混合性胶质细胞、COS、BHK 和 HeLa 细胞（B. Goetze and M. Kiebler 未发表）。

**表 1. pH 和沉淀形成的关系**

| pH 改变 | 结果 |
|---|---|
| 增加 2×BBS/转染液 pH | DNA/$CaPO_4$ 沉淀变快，尺寸变大 |
| 降低 2×BBS/转染液 pH | DNA/$CaPO_4$ 沉淀变慢，尺寸变小 |

**方案**

## 磷酸钙介导的细胞转染

下面的操作介绍将质粒 DNA 转入原代海马神经元细胞的方法。为了优化这一方法的相关参数，我们改变了转染培养基的 pH 和转染后的培养时间，采用了 3 组不同 pH 的 2×BBS 缓冲液（6.90、7.00 和 7.10）和不同的培养时间来建立转染特定质粒的最优条件。在培养 1d 后，用荧光显微镜观察荧光标记蛋白的表达来检测转染效率。

实验操作中，转染培养基的总体积和质粒 DNA 用量分别固定在 2ml 和 3μg，但可以根据实验需要按比例进行改变。

### 材料

#### 试剂

2×BES 缓冲生理盐水（BBS）（pH6.85～7.20）

50mmol/L BES

1.5mmol/L $Na_2HPO_4$

280mmol/L NaCl

调节缓冲液的 pH，选择至少三种 pH 的缓冲液；使用刚校准而清洁的 pH 计。使用2×BBS 工作液作为 pH 参考来制备下一组的 2×BBS 缓冲液。将缓冲液过滤灭菌，密封于 50ml 玻璃瓶中，4℃保存。缓冲液可以保存 12 个月。

待转染的细胞系（原代海马神经元细胞）

HBSS 清洗液（pH 7.3）

135mmol/L NaCl

20mmol/L HEPES

4mmol/L KCl

1mmol/L $Na_2HPO_4$

2mmol/L $CaCl_2$

1mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L 葡萄糖溶液

调节 pH 至 7.3，过滤灭菌，4℃条件下可保存一年。

2.5mol/L $CaCl_2$

从我们的经验来看，反复的冻融 2×BBS 缓冲液和 $CaCl_2$ 溶液会影响转染结果的重复性。因此，我们建议所有的溶液和缓冲液都保存在 4℃。

NMEM-B27 转染培养基（pH 7.4）

向 MEM（Invitrogen）中加入 1mmol/L 丙酮酸钠（Sigma-Aldrich）、15mmol/L HEPES（Invitrogen）、2mmol/L L-谷氨酸（PromoCell），1×B27 补充液（Invitrogen）和 33mmol/L D-葡萄糖（Sigma-Aldrich）。调节 pH 至 7.4，过滤灭菌，保存在 50ml 密封的玻璃瓶中，有效期 2 个月。

质粒 DNA

为了制备高纯度的质粒，使用不含内霉素的 Maxi-prep 试剂盒（如 QIAGEN 不含内霉素的 Maxi 试剂盒）或 CsCl 梯度法。DNA 的纯度通过测量 OD 值来评价，$OD_{260}/OD_{280}$ 大约 1.8 为最佳。用水或 TE 缓冲液溶解质粒。使用前，质粒在 4℃离心。可以用两种质粒共转染，通常，当两种给定质粒的比例在1∶1时，共转染的效率可达 95%（Goetze et al. 2004）。一次使用三种或更多质粒转染比较困难，必须使用合适的标记物在单细胞水平谨慎地控制。

## 仪器

新近校准而洁净的 pH 计。

## 方法

1. 准备待转染的细胞，将它们转移到含有 2ml 转染液的玻璃培养皿中。
2. 为了制备共沉淀，按顺序将下列物质转移的 1.5ml 的离心管中：

   6μl $CaCl_2$

   $x$μl $H_2O$（混合均匀）

3μg 质粒 DNA（缓慢的加入 DNA，同时用枪头充分搅拌混合）

总体积为 60μl，不足部分用水补充。

3. 滴加 60μl 的 2×BBS 缓冲液到 $CaCl_2$/DNA 溶液。每加入 3 滴后轻轻敲打离心管 5 次，使各组分充分混合。不要涡旋！
4. 迅速将 120μl 的转染混合物加入到转染培养基中。与细胞在 36.5℃、5% $CO_2$ 的细胞培养箱中培养。

   为了增加到达细胞表面的共沉淀物，当沉淀可用肉眼观察到时，将含有细胞的培养皿在室温，1000r/min 离心 2～6min。在随后的培养过程中，每 10～15min 观察一次细胞，因为细胞死亡率会随时间而迅速增加。细胞死亡的典型表现就是出现细胞溶胀和细胞核完整性的缺失。当采用离心这一步骤时，与没有离心的细胞相比，离心的细胞与沉淀物的共培养时间可以显著缩短，转染效率增加 50%（B. Goetze et al. 未发表）。

5. 45min 后或直到 6h，神经元细胞被精细的共沉淀物均匀覆盖，这用 10×的物镜就可以清楚地观察到（Goetze et al. 2004）。
6. 吸除转染培养液，替换成预热的 HBSS 清洗液。5min 后在显微镜下观察细胞，此时沉淀应该已经完全溶解。清洗细胞时间不要超过 15min。
7. 吸除 HBSS 缓冲液以除去 DNA/$CaPO_4$ 沉淀物，将细胞在正常培养基中培养。
8. 用合适的方法检测蛋白质的表达（依据实验设计，可以采用报道基因表达的检测、染色和显微镜、免疫染色以及免疫印迹等方法）。

## 疑难解答

问题：不同时间制备的 2×BBS 缓冲液导致不同的转染效率。

解决方法：这是一个经常遇到但原因仍不明了的现象。如果某一次的 2×BBS 缓冲液没有得到好的转染结果，建议重新配制新的缓冲液。除此之外，在配制一系列新的 2×BBS 缓冲液之后，往往发现对于特定的质粒的最佳 pH 条件发生偏移。但这一问题并不关键，因为转染液的 pH 会出现整体平移，因此，对于所有质粒，最优 pH 都会轻微偏向更碱或更酸的 pH。不同时间制备的 2×BBS 缓冲液不能混合使用。

问题：当特定质粒被表达几天以后，经常出现过度表达的假象。

解决方法：以下两种情况会出现这种问题，其一是表达持续几天之后，其二是“强表达”的质粒在培养相对较短的时间后。某些情况下，延长表达时间会观察到荧光标记蛋白的沉淀和错位（B. Goetze 未发表）。这种情况可以通过加入“空”载体而稀释表达载体（在步骤 3 时）来避免。

问题：为了使得这一方法适用于其他细胞系，需要对现有过程做必要的调整。

解决方法：我们已经成功转染了原代混合性胶质细胞、COS、BHK 和 HeLa 细胞（B. Goetze and M. Kiebler 未发表）。一般来说，胶质细胞和已建立的细胞系需要的沉淀物的粒径比神经元细胞要大。因此，有必要延长清洗时间来除去共沉淀物。进一步的解决方法可参考 Lindell 等（2004）。

## 参考文献


Goetze B., Grunewald B., Baldassa S., and Kiebler M. 2004. Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: Application for transfection of mature hippocampal neurons. *J. Neurobiol.* **60:** 517–525.

Goetze B., Grunewald B., Kiebler M.A., and Macchi P. 2003. Coupling the iron-responsive element to GFP—An inducible system to study translation in a single living cell. *Sci. STKE* **2003:** PL12.

Goslin K., Asmussen H., and Banker G. 1998. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing nerve cells*, 2nd edition (ed. G. Banker and K. Goslin), pp. 339–370. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

Graham F.L. and van der Eb A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456–467.

Ishiura M., Hirose S., Uchida T., Hamada Y., Suzuki Y., and Okada Y. 1982. Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2:** 607–616.

Lindell J., Girard P., Muller N., Jordan M., and Wurm F. 2004. Calfection: A novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1676:** 155–161.

# 第三十六章 传递基因进皮肤的基因枪技术

William C. Heiser

Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, Hercules, California 94547

王均 译



## 摘要

基因枪技术是一种快速而又简单地将基因运送到细胞内的技术（Klein et al. 1987; Yang et al. 1990）。这种技术有很多优点：

- 可以直接输送质粒，不必像一些病毒载体系统那样构建复杂的生物载体。
- 理论上，用基因枪技术能够将 DNA 输送到任何细胞。DNA 能穿透细胞壁、细胞膜、角质层或者其他保护性结构，而且，输送不受细胞表面受体或分子的限制。
- 由 DNA 或者 RNA 编码的基因可以在体外或者体内被转运到细胞内，并且能同时转运到所有细胞内。
- 转运具有高效的局部转化特征。
- 基因枪技术特别适合在动物体内诱导有效的免疫反应。表皮是一种简单而有效地进行疫苗研究的对象。向表皮转运 DNA 已经被证明可以同时产生抗体和细胞介导免疫反应。

尽管基因枪技术具有上述许多优点，但这种技术仍然存在一些局限性。首先，转运 DNA 需要一套特殊的设备；其次，转运 DNA 的区域仅限于颗粒到达的区域；最后，基因枪转运经常引发体液免疫反应而不是细胞免疫反应（Boyle and Robinson 2000）。

## 引言

颗粒轰击提供了一种将核酸转运到细胞内的物理途径。最近，伯乐实验室，也是世界上唯一提供该仪器的商业供货商，生产了两种型号的上述设备：一种是 PDS-1000/

He，它最适合将基因转运到微生物、植物和体外培养的动物细胞（McCabe et al. 1998；Heiser 1994）；另一种是 Helios Gene Gun，它是一种特殊设计用于体内哺乳动物细胞基因转运的基因枪，但它也可以用于离体和体外的 DNA 转运。以下参数在开始新实验前应予以优化：每毫克金颗粒装载 DNA 的量，也就是 DNA 装载率（DLR）；每样品管含有的金颗粒的量，又称为颗粒装载量（MLQ）；金颗粒的粒径。典型的基因转运到体内表皮细胞的条件是 1μg DNA 剂量、0.5mg/1.0μm 或 1.6μm 的金颗粒，DLR 相应为 2μg DNA/0.5mg 金颗粒，MLQ 为 0.5mg/样品管。体外转运的 MLQ 通常较低。准备转运的材料时，将 DNA 和金颗粒的亚精胺溶液（微颗粒或者微载体）悬浮在乙醇中。包裹了 DNA 的金颗粒转移到特制管道，并使金颗粒沿着管道长轴均匀分布，紧接着将管道切割制成基因枪的样品管。如果储存方法适当，这种样品管能放置至少一年而不损失活性，方便在很长的一段时间从事一系列实验，这也成为基因枪技术的一个重要优点。

## 方案

## 用 Helios 基因枪递送基因

Helios 基因枪用氦气脉冲将 DNA 包被的颗粒发射出基因枪的样品管，这样除了可以将金颗粒散布到靶细胞外，同时也可以减少氦气冲击波的毁灭效应和对组织的损伤。麻省大学医学院 Shan Lu 的实验室提供了很多使用 Helios 基因枪递送 DNA 到皮肤的实用技术（Wang et al. 2004）。

### 材料

#### 试剂

麻醉剂［甲苯噻嗪（xylazine）1mg/ml 和（或）氯胺酮（ketamine）10mg/ml］

实验动物（通常约 20g 重的小鼠）

$CaCl_2$（1.0mol/L）

0.22μm 滤器过滤除菌，室温保存。

乙醇（100%无水乙醇；Spectrum）

为避免吸水，不用的时候一定要旋紧瓶盖。

表达目的基因的质粒

需要的情况下，用空载体质粒作为空白对照。用标准方法扩增质粒（Sambrook and Russell 2001），并用商业试剂盒纯化（如 Quantum Prep 或 Aurum 柱，伯乐公司产品）。TE 液重悬质粒到 0.5～2mg/ml。

亚精胺（50mmol/L，自由碱；Sigma-Aldrich）

将 1g 亚精胺溶于 6.8ml 无菌 Milli-Q 水中，0.22μm 滤膜过滤除菌，制成 1mol/L 的储液，分装于－70℃保存。用 Milli-Q 水按 1∶20 稀释储液到 50mmol/L 工作液，－70℃保存。

#### 仪器

分析天平

电动剃毛刀

Helios 基因枪系统（Bio-Rad 实验室）

该系统包括 Helios 基因枪、样品管固定器、垫圈和 O 环、9 伏电池、样品管提取工具、特殊的氦气阀和调节器、样品管制备站、氮气阀、带硅橡胶转接管的 10ml 注射器、镀金管（Tefzel）管、1.0μm 和 1.6μm 的金颗粒、样品管切割仪、聚乙烯吡咯酮，干燥剂、样品管储器。

压缩氦气（4.5 级）

压缩氮气（4.8 级），带 1～3psi 调节器。

恒流泵（可选）

带 25 号半英寸长针头的 1ml 注射器

超声水浴

## 方法

### 制备包覆 DNA 的金颗粒

以下描述制备包覆 DNA 金颗粒的方法，这些金颗粒足够填充一个长样品管，通常可以切割成 40～45 个半英寸长的样品管（步骤 21～23）。

1. 在 1.5ml 的离心管中加入 25mg 金颗粒。如需要制备对照样品管，另外称取 25mg 样品，置于另一个 1.5ml 的离心管。除了加入质粒外，两个样品平行处理。

   实验中为了检验目的基因的背景水平，可以制备不含 DNA 的金颗粒，也可以制备包覆不表达目的基因的空载体的金颗粒，作为对照。重复步骤 12～16，将这些金颗粒装入另一个 Tefzel 中。
2. 向每个离心管中加入 100μm 50mmol/L 的亚精胺溶液。
3. 将金颗粒和亚精胺的混合物涡旋混匀几秒，然后超声水浴中超声处理 3～5s 以得到分散完全的金颗粒。
4. 向上述金颗粒溶液中加入 50μm 1μg 每微米的质粒，使 DNA 的载药率为 2，同时恰当制备对照载体。
5. 高速涡旋 DNA 和金颗粒，大约 5s。
6. 以适度速率涡旋的同时，小心地打开离心管盖，将 100μl 1mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液缓慢滴加到混合物中。盖上离心管盖并高速涡旋 5s。
7. 将金颗粒载体室温下静置 10min。
8. 将金颗粒载体离心 15s，弃上清。
9. 轻微涡旋离心管，使得沉淀在剩余的溶液中重悬。
10. 向离心管中加入 1ml 100%乙醇。离心 5s，弃上清，并重复 2 次。
11. 轻微涡旋离心管，使得沉淀在剩余的溶液中重悬。将其转移到一个 15ml 带盖的聚丙烯离心管中。用 200μl 100%乙醇清洗 1.5ml 离心管 2 次，合并到 15ml 离心管中。
12. 向上述 15ml 离心管中加入 2.6ml 100%乙醇，并立刻用这种悬液准备样品管。

### 将 DNA 金颗粒载体悬液转载到样品管

13. 用氮气吹 Tefzel 管使之完全干燥。将没剪切过的 Tefzel 管通过管支撑环，从左侧远

端的 O 环插入到样品管制备站的右边。打开压缩氮气调节压力到 1～3psi，然后用流速计上的调节旋钮调节流速到 0.5L/min，通气 15min。

14. 将带 18 英尺长的硅橡胶转接管的 10ml 注射器装入到注射器套筒，然后将其固定在样品管制备站底部的注射器支架。将 Tefzel 管从样品管制备站上移走。用流速计上的调节旋钮关掉氮气。

    如果用蠕动泵去除 Tefzel 管中的乙醇，要先用乙醇将蠕动泵的速度设定在 3.6～7.2ml/min。用硅橡胶转接管将泵和 Tefzel 管连接起来。移除乙醇的速度越慢，Tefzel 管中的乙醇将被移除的越多。

15. 用切刀切割 30in（75cm）长的 Tefzel 管（对照也需要相同的长度）。保证 30in 长的样品管两端都没有扭曲变形。将 30in 长的样品管的一端与连有 10ml 注射器的硅橡胶转接管相连。连接之前要将注射器芯完全推到底。
16. 涡旋金颗粒载体悬液（如果需要，可以进行超声处理得到均一的悬液）。倒转装有金颗粒载体的离心管数次重悬金颗粒，旋开管盖，将样品管的自由端插入，然后用另一端的注射器快速地将金颗粒载体悬液吸入到样品管中（大约 2in，58cm 深）。在将金颗粒载体悬液吸入样品管中的时候不要涡旋。不要尝试将离心管中的乙醇全部吸干。

    **特别注意**：不要吸入气泡。

17. 从离心管中拿出样品管，放平，继续将悬液吸入样品管内 2～3in。立刻将装载金颗粒的样品管，连同注射器装到样品管制备站上的正确位置。
18. 静置 3～5min。将样品管从硅橡胶连接管上拔出，然后连接到已经固定在样品管制备站底部的 10ml 注射器的硅橡胶连接管上。用注射器将乙醇以 0.5～1in/s 的速率抽除（大概需要 30～60s）。

    如果使用蠕动泵，将调好流速的泵接到样品管上。这样就没有必要在注射器固定器上放置 10ml 注射器。

19. 从样品管拔除注射器及硅橡胶连接管。立刻将样品管制备站中的样品管旋转 180°。3～4s 后打开样品管制备站电源旋转样品管。
20. 旋转样品管 20～30s 后，打开氮气流量计上的控制阀，在样品管转动的情况下，用流速为 0.35～0.4L/min 的氮气吹干样品管。此过程持续 3～5min 后关闭样品管制备站马达开关。关闭氮气流量控制阀，移走样品管。

## 准备 Helios 基因枪的样品管

21. 检查样品管，确定金颗粒载体是否均匀分布。用记号笔在管子上金颗粒不均匀分布的地方做好标记。

    不均匀分布通常仅限于金颗粒沉降外侧的 2in 内，但有时也会在样品管内发现。理想情况下，颗粒应该均一分布在样品管内部的表面；然而，在氮气吹干的时候有可能将颗粒吹到样品管的一端。但只要肉眼判断每 0.5in 长的样品管包含相同量的金颗粒，就可以用来准备基因枪的样品管。

22. 用剪刀将不均匀的部分剪掉。用样品管切割仪将剩余部分切割成 0.5in 的小段。
23. 将样品管储存在装有干燥剂的样品管储藏罐中。盖紧瓶盖，做好标记，用封口膜封

好后储存在 4℃。

在上述条件下，样品管可以储存一年。

### 用 Helios 基因枪转运颗粒

这种基因枪可以用来在体内转运 DNA 到多种细胞，然而，转运 DNA 到表皮细胞最容易。通过调节氦气压力，可以将大部分颗粒递送到角质层下的表皮细胞，而不穿透真皮组织。

24. 为了活化 Helios 基因枪来转运基因，要向基因枪中装入电池和金属垫圈。将氦气软管的一个末端连接在 Helios 基因枪上，另一端连接在氦气控制阀。打开氦气瓶的总阀，调节氦气调节器至合适的压力。

    以将基因转运到老鼠皮肤为例，使用 1.0～1.6μm 的金颗粒时，350psi 的压力通常较为合适。

25. 在基因枪上装上一个空样品管架，打一到两枪以对系统增压。从基因枪中移去空样品管架。
26. 将步骤 21～23 中准备好的样品管装载在样品管架中。将这个样品管架插入到基因枪中。

### 动物的基因转运

27. 依据 IACUC 操作选择合适的麻醉剂注射到动物体内，以麻醉动物。

    推荐注射 200μl 甲苯噻嗪（1mg/ml）和氯胺酮（10mg/ml）的混合物到 20g 重的小鼠腹腔。

28. 将动物目标区域的毛剃净，通常是胸部和腹部，然后刷一下。耳背也是一个很好的位点，并且不需要剃毛。
29. 将基因枪放在靶位点并且开火。
30. 在适当时间后，用合适的分析方法分析转入的基因是否表达。

## 疑难解答

问题（步骤 16）：溶液成块状，分散不均匀。

解决方法：有时出现别针头大小的团聚颗粒，并且很快沉淀在 15ml 离心管的底部。超声处理可以破坏这些团聚。

问题（步骤 16 和 17）：在整个样品管均匀分布金颗粒。

解决方法：这些步骤必须在一起做。最好在使用包覆 DNA 的金颗粒前练习，目的是在 15ml 离心管中制备金颗粒的悬液并将其以悬液的形式吸入到 Tefzel 样品管中，以保证 Tefzel 样品管全长中都有等量的金颗粒。将差不多所有的金颗粒吸入到管中是可能的。

## 怀念

Bill Heiser 经过与癌症的长期斗争于 2006 年 1 月 19 日离开了我们。很多朋友和同

事都非常想念他。以下内容为本书作者之一 Theodore Friedmann 所写。

我请 Bill Heiser 编写本章时，他表现出了极大的热情。他说他非常希望自己能对本书有所贡献。他的反应是非同寻常的，很多人在请同事写书时得到的是无言的沉默。但是由于他平日里的优雅与热心，他说他非常愿意做这件事，因为他的病已经使他无法从事他非常想念的研究工作了。他是最快提交书稿的作者之一，这不仅仅是因为他一贯尽职尽责，还因为他清楚地知道留给他写作的时间比其他作者要少得多。我愿意相信他在准备书稿与面对疾病的过程中感受到了快乐。

## 参 考 文 献


Boyle C.M. and Robinson H.L. 2000. Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations. *DNA Cell Biol.* **19:** 157–165.

Heiser W.C. 1994. Gene transfer into mammalian cells by particle bombardment. *Anal. Biochem.* **217:** 185–196.

Klein T., Wolf E., Wu R., and Sanford J. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327:** 70–73.

Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Wang S., Joshi S., and Lu S. 2004. Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol. Biol.* **245:** 185–196.

Yang N.-S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., and McCabe D. 1990. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87:** 9568–9572.

# 第三十七章 优化体外哺乳动物细胞的电转染

Shulin Li

Department of Comparative Biomedical Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803

王均和许严伟 译



## 摘要

电转染可用于基因功能、启动子活性和基因调控的研究，它还可用于建立转基因或基因敲除胚胎干细胞，以及传递编码 RNA 的肿瘤抗原到树突状细胞中，用于肿瘤疫苗的研究。电转染也可将治疗基因传递到免疫细胞中用于肿瘤治疗，或将治疗基因传递到干细胞中用于不同类型疾病的治疗（表 1）（Li 2004）。相比较其他的转染方法而言，电转染具有快捷、方便和廉价的特点。电转染最显著的优点是它事实上可以转染任何细胞系，与细胞的形态、大小、传代次数或细胞类型无关，而电转染的效率可用细胞特异性的电穿孔缓冲液显著增强（表 1）。电转染还可以避免引入除靶 DNA 或 RNA 分子以外的生物材料（临床应用的重要考量）。除此之外，电转染不会显著改变细胞的微分子环境，而用化学方法或病毒转染将引入生物材料并导致细胞类分子环境的改变（Li et al. 2005）。电转染的材料如电穿孔管可以重复利用，因此可以节约成本。电转染的缺点在于它很难大规模应用于临床，有些电穿孔缓冲液还可能以一些未知的方式危害细胞的功能，而且电转染也可能导致细胞死亡。

**表 1. 体外电穿孔缓冲液及转染效率**

| 电穿孔缓冲液(供应商) | 细胞类型 | 每毫升细胞数 | 遗传物质 | 转染效率/% | 资源 |
|---|---|---|---|---|---|
| Opti-MEM(Invitrogen) | DC | $10\times10^6$～$40\times10^6$ | DNA | 45 | Van Tendeloo et al. (2001) |
| | | | RNA | 89 | |

续表

| 电穿孔缓冲液(供应商) | 细胞类型 | 每毫升细胞数 | 遗传物质 | 转染效率/% | 资源 |
|---|---|---|---|---|---|
| Cyto pulse Low-conductivity Media (Cyto Pulse Sciences) | DC | $5\times10^5$ | RNA | 89～95 | Michiels et al. (2005) |
| Opti-MEM(invitrogen) | DC | $4\times10^6$ | RNA | 70～80 | Van Meirvenne et al. (2002) |
| OptiBuffer(Thermo Electron) | DC | $50\times10^6$ | RNA | 100 | Bonehill et al. (2003) |
| OptiBuffer(Thermo Electron) | T 细胞 MSC | $50\times10^6$ | RNA | 50 | Smits et al. (2004) |
| | | | RNA | 90 | |
| Nucleofector Kits(Amaxa) | NK 细胞 | $10\times10^6$～$100\times10^6$ | DNA | 50 | Trompeter et al. (2003) |
| Nucleofector (Amaxa) | MSC | $2\times10^6$ | DNA | 80 | Haleem-smith et al. (2003) |
| Opti-MEM(Invitrogen) | CD34 骨髓细胞 | $30\times10^6$ | DNA | >30 | Van Tendeloo et al. (2000) |
| MEM(Invitrogen) | 原位神经细胞 | $5\times10^6$ | DNA | 20 | Mertz et al. (2002) |
| Hypo-osmolar/Iso-osmolar 缓冲液(自制) | CHO,B16F1 | $5\times10^6$ | DNA | 65～85 | Cegovnik and Novakovic (2004) |
| Pulsing 缓冲液 | CHO7 | $80\times10^6$ | DNA | 80 | Li et al. (2002) |

## 引言

电穿孔通过外部施加的电脉冲诱导增强细胞膜的通透性，电转染正是利用这种电脉冲诱导增强的细胞膜通透性使得质粒 DNA 或者 RNA 穿透细胞膜进入细胞内部的。电转染也称为电插入或是电转（Weaver 1993；Andre and Mir 2004；Golzio et al. 2004），它最早用于哺乳动物细胞转染是在 1982 年（Neumann et al. 1982）。Wong 和 Neumann (1982) 用电转染的方法将质粒转移到鼠成纤维细胞后成功地获得了胸苷激酶基因的表达。虽然电转染已经用于超过 400 种细胞系的转染，但是转染效率却不尽相同（Cegovnik and Novakovic 2004）。大多数的电转染体系包括一个脉冲电源和一个用于装载电穿孔管的电穿孔槽，细胞和 DNA 就置于电穿孔管中。一些电穿孔仪配有不同型号的电极，可用于体内和体外的转染。最常见的电穿孔仪列在表 2 中。对各种型号电极的详细介绍可参考 Hofmann (1995)。

**表 2. 电穿孔系统**

| 制造商 | 模型 | 网页地址 |
|---|---|---|
| Bio-Rad | 基因脉冲器 II | www.bio-rad.com |
| Thermo-Electron | Celljectt Pro electroporator | www.thermo.com |
| BTX | ECM830 | www.btxonline.com |
| Amaxa | Nucleofector 装置 | www.amaxa.com |
| Tritech Research | 克隆化的注射枪 | www.tritechresearch.com |
| Cyto Pulse Sciences | PA-4000 脉冲发生器 | www.cytopulse.com |
| Eppendorf | Multiporator 4308 | www.eppendorf.com |
| MaxCyte | 大体积流量的电穿孔 | www.maxcyte.com |

常用的电穿孔技术是通过电脉冲处理，在细胞膜上形成暂时的电穿孔，从而使 DNA 之类的大分子通过这些电穿孔从细胞膜外扩散进细胞质（Neumann et al. 1982；de

Gennes 1999)。这些电穿孔可以持续存在几毫秒到几分钟，持续时间的长短取决于所使用的电场强度和电脉冲持续的时间（Klenchin et al. 1991；Gabriel and Teissie 1997）。同时，使用电压越高，脉冲持续时间越长，在细胞膜上的电穿孔也越大。由于 DNA 分子尺寸相对较大，因此，DNA 的电转染通常需要较长的电脉冲时间以产生相对较大的孔径来帮助细胞摄取 DNA，相比较而言，小分子只需要施加很短的电脉冲时间。DNA 电转染的电脉冲阈值时间一般认为是 1ms，但也有一些报道用 100μs 成功完成了 DNA 的电转染（Cegovnik and Novakovic 2004）。增大电场强度和延长电脉冲持续时间的风险在于它可能引起不可逆的细胞膜泄露，导致细胞破裂和细胞死亡。通常在外部电场强度超过跨膜电势差的极限（250mV），或者当跨膜电位达到 0.5～1.5V 时，会造成细胞膜不可逆泄露（Weaver 1993；Golzio et al. 2004）。跨膜电势差依赖于膜的导电性、脉冲缓冲液、细胞大小和形态、细胞在电场的排列方式和电场密度等（Golzio et al. 2004）。跨膜电位则主要依赖于细胞大小和所用电场和测量电压的细胞膜两者之间的角度（Weaver 1993）。

另一种通过电穿孔摄取 DNA 的方式是电泳法。因为 DNA 带有负电性，电场可以诱导负电性的 DNA 分子从膜外移动到膜内，然后聚集在细胞质（Wolf et al. 1994）。这种方式被下面的现象支持：尽管在电脉冲之后细胞膜上的电穿孔还没有“愈合”，但此时加入 DNA 并不会造成 DNA 被细胞摄取。然而，最近一项使用荧光标记 DNA 和显微摄像技术的细致研究表明，DNA 在电脉冲的作用下并没有立刻被转运到细胞质（Golzio et al. 2002）。相反，DNA 在电穿孔后 1ms 内和细胞膜形成一种复合物或者聚集体，几分钟后，DNA 被转运到细胞质中，然后再慢慢地转移到细胞核中（Golzio et al. 2002），而基因表达发生在几个小时之后（Golzio et al. 2002）。因此，电转染的限制性步骤之一可能是将 DNA 从细胞质中转移到细胞核。用一种可以促进 DNA 核转运的电转染缓冲液 Nucleofecter 试剂盒（Amaxa）可以大大增强电转染的效率，证实了这一思想。类似的证据还包括，用带有核定位信号序列的质粒 DNA 也显著增强基因在肌纤维中的表达水平（Li et al. 2001）。

虽然不同类型的细胞的细胞膜结构是很相似的，但电转染的效率却大不相同。一个重要影响因素是电转染的缓冲液（表 1）。使用合适的缓冲液可以将转染效率提高 50%～98%。通常的规律是离子常数低的缓冲液能够提高细胞转染效率（Golzio et al. 2004）；然而，不同的细胞系需要使用的缓冲液组成成分不同（Cegovnik and Novakovic 2004）。Amaxa 公司研制了可用于高效转染 300 种不同细胞系的三种缓冲液（Iversen et al. 2005）。我们发现高效转染的关键是 Nucleofector 缓冲液，而不是电穿孔系统，因为用相同的 Amaxa 缓冲液和不同的电穿孔系统，获得的转染效率基本相当（S. Li，未发表）。

## 方案

### 电转染哺乳动物细胞

接下来的操作步骤描述用电穿孔技术将质粒 DNA 转染到哺乳动物细胞中的方法。影响电转染效率的因素包括电穿孔缓冲液、质粒结构以及细胞的形态和大小。通常情况

下，悬浮细胞难被转染，黏附细胞相对容易；体积小的细胞难被转染，而体积大的细胞，如肌肉细胞容易被转染。使用大的质粒 DNA（>13kb）似乎会降低转染效率。无论细胞的大小和表型，在小体积里维持高的细胞浓度有利于提高转染效率（Trompeter et al. 2003）。当细胞密度低于 $5\times10^6$ 个/ml 时，转染效率通常很低（S. L 未发表），因此，推荐使用细胞密度为 $1\times10^7$ 个/ml。

## 材料

### 试剂

细胞培养基（完全培养基和无血清培养基）

待转染细胞系

电穿孔缓冲液

商业电穿孔缓冲液列于表 1，按照制造商的介绍储存这些缓冲液。非商业电穿孔缓冲液配方如表 3 所示，使用前无菌过滤并在室温下储存。

磷酸盐缓冲液（PBS）

质粒 DNA

柱色谱纯化。

1×胰蛋白酶-EDTA（0.05%）

**表 3．Noncommericial（"自制"）电穿孔缓冲液的构成**

| 电穿孔缓冲液名称 | 电穿孔缓冲液的组成 | 设计者 |
|---|---|---|
| Hypo-osmolar 缓冲液 | KCl(25mmol/L) | Zimmermann(1996) |
| Iso-osmolar 缓冲液 | $KH_2PO_4$(0.3mmol/L) | |
| | $K_2HPO_4$(0.85mmol/L) | |
| | Myo-inositol(90mOsm/kg,pH7.2) | |
| Pulsing 缓冲液 | KCl(125mmol/L) | Li et al. (2002) |
| | NaCl(15mmol/L) | |
| | 葡萄糖(3mmol/L) | |
| | HEPES(25mmol/L) | |
| | $MgCl_2$(1.2mmol/L,pH7.4) | |

### 仪器

电穿孔管（BTX Instruments，Bio-Rad，Invitrogen，Amaxa 或 Thermol Electron）

用于哺乳动物细胞电穿孔管通常宽 1cm，内径为 4mm。内径为 2mm 的电穿孔管可用于减少脉冲持续时间。

电穿孔系统（表 2）

## 方法

### 准备待电穿孔的细胞

1. 在电穿孔前24～72h，将细胞分离并在合适的含血清的完全培养基中培养。

   这步操作要保证细胞健康并有高增殖能力，这将增强细胞对电穿孔的耐受力并提高电转染的效率。

2. 当培养的细胞达到对数生长中期或者末期时（或者60%～90%覆盖率），收集细胞。

   对于黏附细胞，用1×胰蛋白酶-EDTA溶液（预热到37℃）消化，然后室温下用PBS或者其他清洗缓冲液洗一次。

3. 20℃，250*g* 离心5min收集细胞。用电穿孔缓冲液重悬细胞至细胞密度为每100μl $5\times10^5$～$5\times10^6$ 个细胞。

4. 将2～10μg DNA和100μl细胞悬液混合，转移到电穿孔管中。

   虽然有些时候推荐在电穿孔前孵育细胞和DNA的混合物，但并没有必要。这步操作应该在室温下进行。

### 电穿孔

5. 轻敲装有DNA和细胞的电穿孔管（细胞在管中放置了一段时间后会沉淀），然后置入电穿孔槽中。
6. 选择合适的电穿孔仪参数并开始电穿孔。
7. 电穿孔后立刻向管中加入500～900μl完全培养基，并将电穿孔过的细胞转移到合适的培养器皿中（如6孔板）。加入培养基维持细胞继续生长。

   对于稳定转染，只需从管中转移一部分电转染的细胞（1/10～1/20体积）到培养器皿中。

8. 在合适的生长条件下培养细胞过夜。如果发现明显的细胞死亡，更换完全培养基。

### 基因表达分析

9. 如果实验的目的是稳定转染，直接跳到步骤10。对于瞬时表达，在转染24～72h后收集细胞，选用恰当的方式检测基因表达，如使用流式细胞术、RNA杂交、免疫或酶检测。如果转染的基因带有一段荧光标签，可以用荧光显微镜观察。
10. 获得稳定转染的细胞：在完全培养基中生长48～72h后，将细胞转移到合适的培养基。在合适的条件下继续培养细胞。

## 操作和参数举例

1. 细胞和密度：100μl细胞培养基中含 $10^6$ 个SVEC（ATCC）细胞。
2. 转运材料：2μg pEGFP-N1质粒DNA（Clontech）。
3. 电穿孔缓冲液：DMEM细胞培养基。
4. 准备：

   a. 用胰蛋白酶-EDTA消化细胞并用无血清的DMEM培养基清洗细胞一次。

b. 室温，250$g$离心5min收集细胞。

c. 用100μl DMEM培养基重悬细胞并与2μg质粒DNA混合。

d. 将混合物转移到一个内径为4mm的电穿孔管中。

e. 将管置入BTX ECM830型电穿孔仪的电穿孔槽中，施加150V/cm的短暂电压50ms。

## 疑难解答

问题（步骤3）：选择电穿孔缓冲液。

解决方法：如果需要高水平的转染效率，按照表1所示，参照制造商推荐的方法选择合适的细胞特异性Amaxa缓冲液。这些电穿孔缓冲液对于那些难以用化学方法转染的细胞系非常有效，转染效率可高达98%。Amaxa的电穿孔缓冲液也可以和其他的电穿孔系统配合使用；但参数需要优化。值得注意的是，重悬Amaxa缓冲液的储藏期只有3个月，并且相对昂贵。如果经费有限，我们建议使用其他品牌的缓冲液，或者低渗/等渗缓冲液（表3中列出了配方）。这些缓冲液相对便宜，在一些细胞系中能够获得高转染水平。而对于稳定转染，并不关心转染效率时，我们建议使用细胞培养基以降低费用。为了得到高水平的RNA转染，建议使用Opti-MEM、OptiBuffer或者Cyto Pulse培养基。

问题（步骤6）：选择合适的电穿孔参数。

解决方法：体外有效转染细胞的电穿孔系统有很多类型（表2），但是需要注意的是，一个电穿孔系统的参数并不适合另一套系统。推荐新手使用Amaxa电穿孔仪，因为这个系统对不同细胞系预先设定了最佳电穿孔程序，操作简单。如果需要同时对体外和体内进行电转染研究，推荐使用BTX ECM830，因为该系统适合使用不同的电极，以用于体外或者体内的基因转染。BTX ECM830转染细胞的标准电穿孔参数是150V/cm，50ms的短暂电压和一个脉冲。为了最大化转染效率，用户可以改变脉冲的时间、电脉冲的次数或者脉冲电压。有些系统没有安装可以调节电脉冲时间的按钮，但使用者可以通过调节电容来改变电脉冲时间（电脉冲时间=电容×电阻）(Weaver 1995)。对于释放方波的BTX ECM830而言，放热通常不会有影响，但是当使用多电极或者长电脉冲时间时应予以考虑。在这种情况下，可以在电穿孔前将电穿孔管预冷。

问题（步骤7）：试管循环使用。

解决方法：大多数制造商都建议每次转染都是用新的电穿孔管，但并没有必要性。电穿孔管经过合适的处理后可以循环使用。处理方法如下（S. Li未发表）：

1. 用去离子水和70%乙醇冲洗2次。
2. 将洗干净的管置于细胞培养超净台，紫外灯下照射1h。
3. 盖好盖子，以便于下次电转染。试管的重复使用次数没有限制。

## 致谢

本工作由 NCI/NIH (R01CA98928) 和 NIDCR/NIH (R21DE14682)。本章在 Katie Watson 和 Ryan Craig 的帮助下完成。

## 参考文献


Andre F. and Mir L.M. 2004. DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther.* (suppl. 1) **11:** S33–S42.

Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S., Michiels A., Zhang Y., van der Bruggen P., and Thielemans K. 2003. Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res.* **63:** 5587–5594.

Cegovnik U. and Novakovic S. 2004. Setting optimal parameters for in vitro electrotransfection of B16F1, SA1, LPB, SCK, L929 and CHO cells using predefined exponentially decaying electric pulses. *Bioelectrochemistry* **62:** 73–82.

de Gennes P.G. 1999. Passive entry of a DNA molecule into a small pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7262–7264.

Gabriel B. and Teissie J. 1997. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys. J.* **73:** 2630–2637.

Golzio M., Rols M.P., and Teissie J. 2004. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods* **33:** 126–135.

Golzio M., Teissie J., and Rols M.P. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 1292–1297.

Haleem-Smith H., Derfoul A., Okafor C., Tuli R., Olsen D., Hall D.J., and Tuan R.S. 2005. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol. Biotechnol.* **30:** 9–20.

Hofmann G.A. 1995. Instrumentation. In *Animal cell electroporation and electrofusion protocols* (ed. J.A. Nickoloff), pp. 41–60. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Iversen N., Birkenes B., Torsdalen K., and Djurovic S. 2005. Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. *Genet. Vaccines Ther.* **3:** 2.

Klenchin V.A., Sukharev S.I., Serov S.M., Chernomordik L.V., and Chizmadzhev Yu A. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* **60:** 804–811.

Li L.H., Shivakumar R., Feller S., Allen C., Weiss J.M., Dzekunov S., Singh V., Holaday J., Fratantoni J., and Liu L.N. 2002. Highly efficient, large volume flow electroporation. *Technol. Cancer Res. Treat.* **1:** 341–350.

Li S. 2004. Electroporation gene therapy: New developments in vivo and in vitro. *Curr. Gene Ther.* **4:** 309–316.

Li S., Wilkinson M., Xia X., David M., Xu L., Purkel-Sutton A., and Bhardwaj A. 2005. Induction of IFN-regulated factors and antitumoral surveillance by transfected placebo plasmid DNA. *Mol. Ther.* **11:** 112–119.

Li S., MacLaughlin F.C., Fewell J.G., Gondo M., Wang J., Nicol F., Dean DA., and Smith L.C. 2001. Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Ther.* **8:** 494–497.

Mertz K.D., Weisheit G., Schilling K., and Luers G.H. 2002. Electroporation of primary neural cultures: A simple method for directed gene transfer in vitro (erratum *Histochem. Cell Biol.* [2003] **119:** 175). *Histochem. Cell Biol.* **118:** 501–506.

Michiels A., Tuyaerts S., Bonehill A., Corthals J., Breckpot K., Heirman C., Van Meirvenne S., Dullaers M., Allard S., Brasseur F., van der Bruggen P., and Thielemans K. 2005. Electroporation of immature and mature dendritic cells: Implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther.* **12:** 772–782.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., and Hofschneider P.H. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1:** 841–845.

Reiss M., Jastreboff M.M., Bertino J.R., and Narayanan R. 1986. DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137:** 244–249.

Smits E., Ponsaerts P., Lenjou M., Nijs G., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N., and Van Tendeloo V.F. 2004. RNA-based gene transfer for adult stem cells and T cells. *Leukemia* **18:** 1898–1902.

Trompeter H.I., Weinhold S., Thiel C., Wernet P., and Uhrberg M. 2003. Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection. *J. Immunol. Methods* **274:** 245–256.

Van Meirvenne S., Straetman L., Heirman C., Dullaers M., De Greef C., Van Tendeloo V., and Thielemans K. 2002. Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* **9:** 787–797.

Van Tendeloo V.F., Ponsaerts P., Lardon F., Nijs G., Lenjou M., Van Broeckhoven C., Van Bockstaele D.R., and Berneman Z.N. 2001. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: Superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* **98:** 49–56.

Van Tendeloo V.F., Willems R., Ponsaerts P., Lenjou M., Nijs G., Vanhove M., Muylaert P., Van Cauwelaert P., Van Broeckhoven C., Van Bockstaele D.R., and Berneman Z.N. 2000. High-level transgene expression in primary human T lymphocytes and adult bone marrow CD34+ cells via electroporation-mediated gene delivery. *Gene Ther.* **7:** 1431–1437.

Weaver J.C. 1993. Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J. Cell. Biochem.* **51:** 426-435.

———. 1995. Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* **47:** 1–26.

Wolf H., Rols M.P., Boldt E., Neumann E., and Teissie J. 1994. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* **66:** 524–531.

Wong T.K. and Neumann E. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107:** 584–587.

Zimmermann U. 1996. The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: Fundamentals and applications. In *Electromanipulation of cells* (ed. U. Zimmermann and G.A. Neil), pp. 1–106. CRC Press, Boca Raton, Florida.

# 第三十八章　用于小鼠胚胎内高效基因转递的子宫内微电穿孔技术

Tomomi Shimogori
Critical Period Mechanisms Research Group, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Brain Science Institute, Saitama 351-0198. Japan
王均　译



## 摘要

为了理解胚胎发育的遗传学机制，有必要在特定区域和特定时间内过表达或者不表达某些目的基因。由于实验方便易行，鸟类的胚胎的模式系统在研究发育过程中被广泛使用。这主要是借助一种鸡胚电穿孔的新技术，成功地将基因导入到胚胎中。与之相反，由于哺乳动物的胚胎被母体的子宫包围，在发育的大多数阶段，用传统的办法在宫内特定区域对哺乳动物胚胎的遗传操纵变得十分困难，甚至根本不可能。针对这一难点，我们开发了子宫内微电穿孔技术，该技术利用置入到小鼠胚胎脑室的精细钨丝和铂丝将 DNA 导入到小鼠胚胎中。虽然基因异位表达仅持续几天时间，但从胚胎期到成熟后，均能检测到这种暂时性影响大脑发育的效应。该方法简单，在胚胎的大多数部位都容易实施，而且用这种方法可以导入多种不同的基因，甚至同时导入多种基因。

## 引言

无论脊椎动物还是非脊椎动物，身体各部分以及神经系统网络的发育形成都需要特定基因在胚胎发育过程中的不同时间和部位的特异性表达。因此，在胚胎发育过程中，对一些基因进行时空上的操纵，控制特定基因的表达成为了解这些基因在胚胎发生中真正功能的最有力的手段。为了研究脊椎动物的发育机制，鉴于非洲蟾蜍和斑马鱼胚胎的易操作性以及透明性，通常在这些物种进行遗传操纵。但如果要了解复杂器官如大脑的发育机制，就需要使用哺乳动物的实验模型。小鼠是其中最常用的模型之一，因为可以在转基因动物中方便地研究特定基因的功能。然而，由于小鼠的不透明性以及子宫壁障

碍，用电穿孔技术在小鼠身上对基因进行特定时空操纵显得比较困难。

鸡胚电穿孔技术可以对导入基因的功能进行快速、直接的检测（Muramatsu et al. 1997；Itasaki et al. 1999；Nakamura et al. 2000）。可想而知，将这一技术应用到小鼠胚胎发育研究，可以进行基因功能的快速检测，这比利用基因敲除或转基因品系的建立花的时间要短得多。此外，子宫内电穿孔也使得在时间或空间上调控目的基因的表达成为可能。一些实验室通过在小鼠胚胎中用子宫电穿孔技术成功实现报道基因的传输（Saito and Nakatsuji 2002；Tabata and Nakajima 2001；Borrell et al. 2005）。这些研究结果表明使用镊形电极（如 NEPA 基因公司的产品 CUY650-P5）可以在胚胎发育12.5d后很长一段时间内成功地将目的基因导入胚胎细胞。针形电极的发明进一步使得鸡胚电穿孔技术可以在点区域实现基因转染（Momose et al. 1999），方便了特定基因如形态发生素的空间功能分析。我们先前介绍了利用针形电极的子宫内微电穿孔技术将特定基因精确导入小鼠胎脑的方法（Fukuchi-Shimogori and Grove 2001）。因为电极的插入很容易伤害子宫，并引起低存活率，所以对电极的大小必须进行精确的控制，而依靠在子宫内特定角度放置光学纤维，可以观察子宫内完整的胚胎。

在这一章节中，我们将描述电极的制作以及如何在小鼠早期胚胎（早到 E10.5）中利用子宫内微电穿孔实施特定区域的基因传输。需要注意的是，这种基因传输的方式仅造成基因的瞬时表达，如果要实现永久的基因表达，可以使用编码 Cre-重组酶和 R26R 的报告小鼠品系（Jackson 实验室）。研究表明，将 siRNA 通过电穿孔技术导入鸡胚，可以沉默特定基因的功能（Nakamura et al. 2004），因此，结合 RNA 干扰和宫内微电穿孔技术，将基因敲除和转基因小鼠一起使用，将成为强有力研究胚胎发育的手段。

## 方案

## 子宫内小鼠胚胎的电穿孔

利用置于靶区域任何一侧的针型电极，精确地将遗传物质导入发育的小鼠胚胎的脑组织中。将 DNA 和示踪染料的混合物注射入组织，并通过电脉冲发生器在组织中产生电脉冲，同时用光纤传导提供光源来监控整个过程。

### 材料

#### 试剂

待导入的 DNA，溶液（1μg/μl）
乙醇（50%）
固绿 FCF 蛋白质染色试剂（Sigma-Aldrich）
磷酸盐缓冲液（PBS）
怀孕小鼠（E10.5 或者怀孕期更长）
戊巴比妥钠

#### 仪器

不锈钢制小手术夹（9mm，ROBOZ）

电极

将装在塑料管中连接有金属针（WPI 5428）上的钨丝和铂丝（A-M 系统）用砂纸磨尖（图 1B）制备电极。电极用一薄层绝缘漆抛光，待抛光漆干了以后，用丙酮浸泡的棉花刷将金属针从尖端（约 200μm）移去。

光纤光源（Leica）

手术镊（ROBOZ）

玻璃毛细管（Stoelting 公司）

拉长并用镊子固定尖端（图 1A）。

微操作器（micromanipulator）（KD scientific）

微吸液器（micropipette）

脉冲发生器（Model 2100，A-M 系统）

手术剪（ROBOZ）

缝合线（3-0，Dexon II）

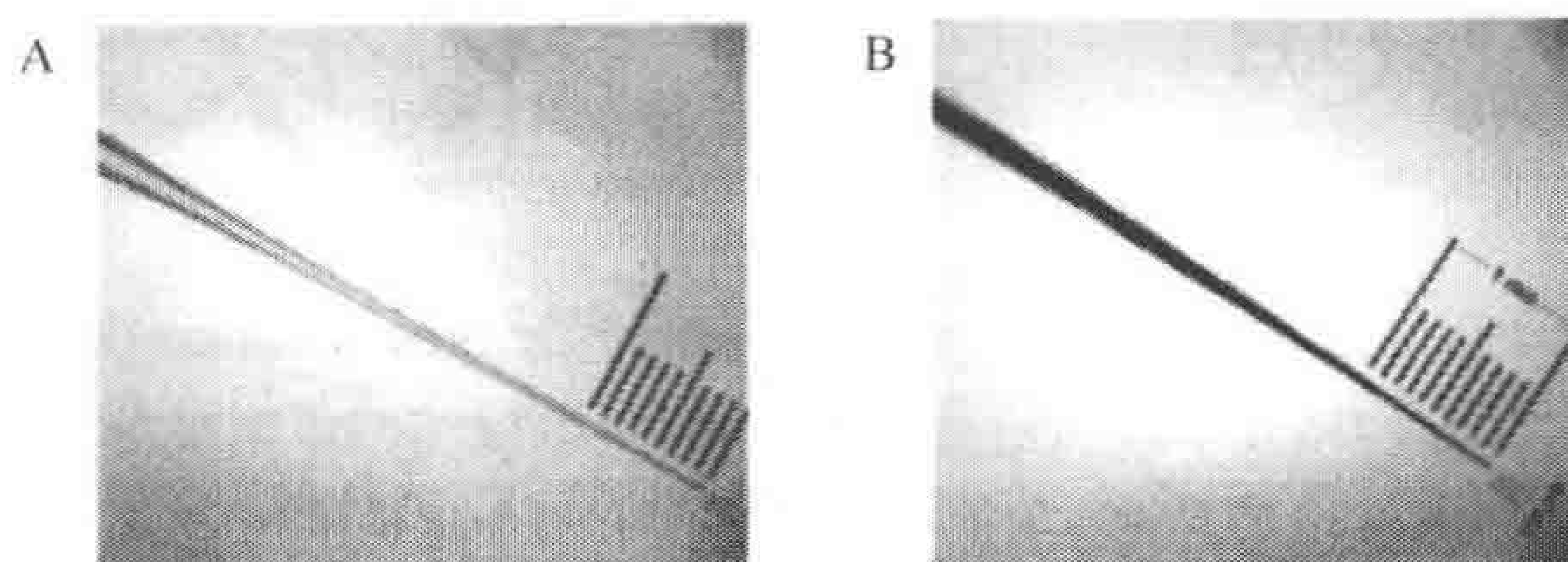


图 1. A. 用于注射的玻璃毛细管的形状，通过微量吸液管拉长而成，尖端外径约为 20μm。为防止伤害子宫，离尖端 1mm 处的外径应不超过 50μm。B. 钨丝和铂丝用砂纸磨尖，并用一薄层绝缘漆抛光。

## 方法

1. 腹腔内注射戊巴比妥钠（50μg/g 体重）麻醉孕鼠（E10.5 或孕期更长）。5～10min 后，用剃须刀的刀刃刮去小鼠腹部的毛，并用 50%乙醇洗涤。
2. 在腹腔剪一个 2.5cm 或更短的小口，用镊子小心取出子宫角，把其放在 PBS 浸润的棉纱上，然后把它们放在伤口周围。

   用 PBS 维持子宫的湿度很重要。
3. 用光纤光观察胚胎。用温热的 PBS（37℃）浸湿光纤末端和子宫角。用食指和中指固定住光纤，将子宫放在拇指和光纤之间。轻轻挤压子宫，使胚胎靠近子宫壁（图 2）。

   用 PBS 浸润的棉花刷摩擦子宫表面可将胚胎转到位。
4. 用浓度为 1%的固绿蛋白质染液配制 1μl DNA（1μg/μl）
5. 胚胎到位以后，用微操作器将 DNA-固绿染料混合液注入侧脑室内。
6. 将钨阴极和铂阳极插入到子宫中，使靶区域在两个电极之间（图 2）。在 1s 间隔内连续用脉冲发射器施加三方波电流脉冲（7～10V，100 ms）3 次。

   注意手术时间越短，存活率越高。每只孕鼠最长手术时间为 30min。

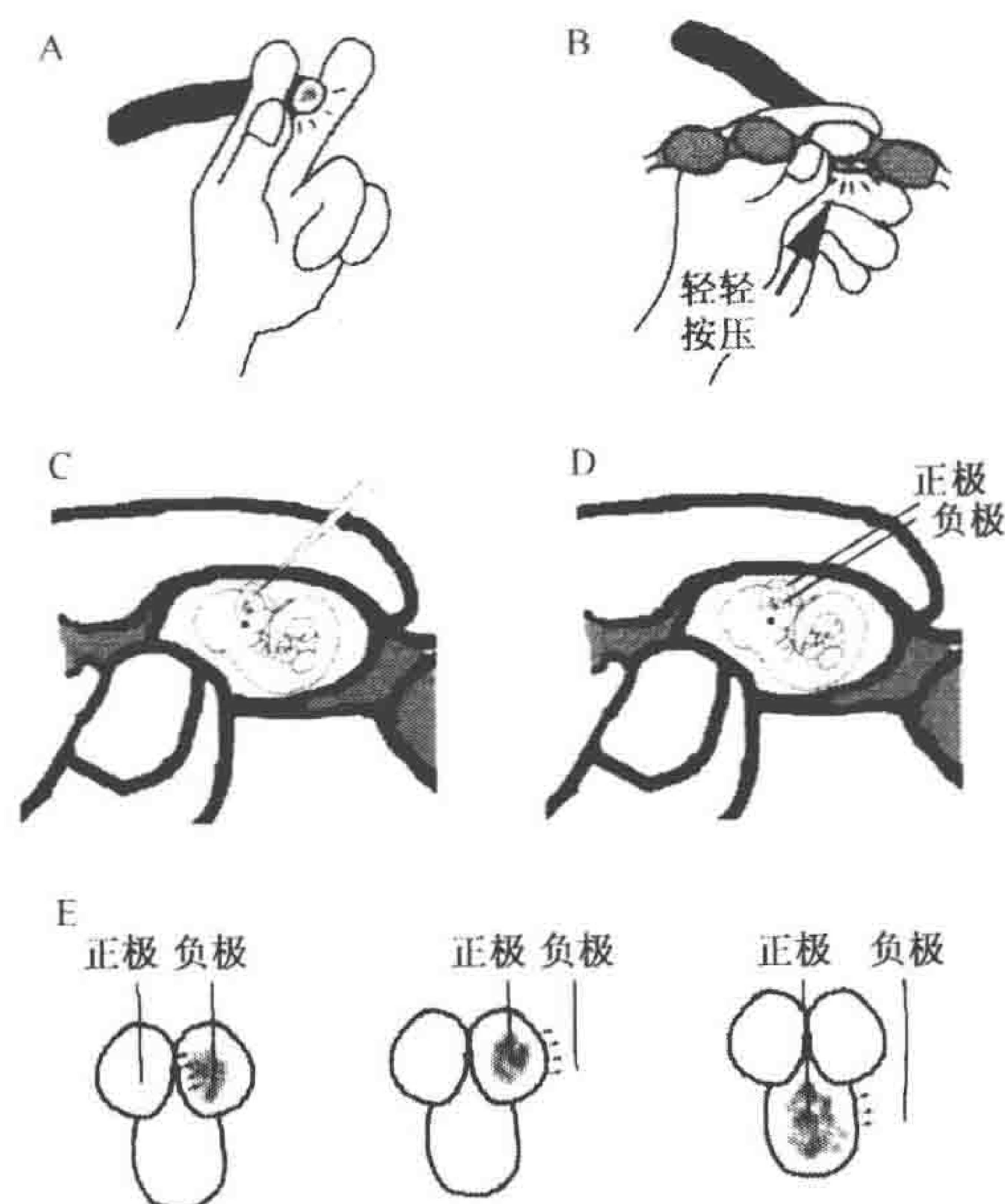



图 2．A．在食指和中指间固定光纤。B．将子宫角放在光源和拇指之间。按压子宫使胚胎到达靠近膜的位置。C．注射 1μl DNA 溶液到脑室。D．将钨负电极和铂正电极分别插入到左右两个半球，然后输入一系列三方波电流脉冲。E．不同电穿孔中两个电极的位置。

7．将子宫角放回原处，加入少量 PBS（约 500μl）。缝合子宫壁上的手术切口，并用 9mm 的小手术夹闭合皮肤。在小鼠从麻醉作用中清醒之前（约 2h）保持小鼠的温度。

胚胎的存活率以及细胞转染效率依胚胎和电穿孔位置不同而各异。在 E11.5 进行电穿孔，有 60%的胚胎存活，存活的胚胎中 50%显示出电穿孔成功。依赖于胚胎所处发育阶段，以及电穿孔的区域对实验条件优化十分必要。

## 致谢

感谢 N．P．Murphy 博士对此稿的评阅。

## 参 考 文 献

Agarwala S., Sanders T.A., and Ragsdale C.W. 2001. Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science* **291:** 2147–2150.

Borrell V., Yoshimura Y., and Callaway E.M. 2005. Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation. *J. Neurosci. Methods* **143:** 151–158.

Fukuchi-Shimogori T. and Grove E.A. 2001. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* **294:** 1071–1074.

Itasaki N., Bel-Vialar S., and Krumlauf R. 1999. "Shocking" developments in chick embryology: Electroporation and in ovo gene expression. *Nat. Cell Biol.* **1:** 203–207.

Momose T., Tonegawa A., Takeuchi J., Ogawa H., Umesono K., and Yasuda K. 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev. Growth Differ.* **41:** 335–344.

Muramatsu T., Shibata O., Ryoki S., Ohmori Y., and Okumura J. 1997. Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233:** 45–49.

Nakamura H., Watanabe Y., and Funahashi J.A. 2000. Misexpression of genes in brain vesicles by in ovo electroporation. *Dev. Growth Differ.* **42:** 199–201.

Nakamura H., Katahira T., Sato T., Watanabe Y., and Funahashi J. 2004. Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. *Mech. Dev.* **121:** 1137–1143.

Saito T. and Nakatsuji N. 2001. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev. Biol.* **240:** 237–246.

Tabata H. and Nakajima K. 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: Visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* **103:** 865–872.

# 第三十九章　体内传输基因的 lipoplex 和 LPD 纳米颗粒

Shyh-Dar Li*，Song Li† 和 Leaf Huang*

* Division of Molecular Pharmaceutics, School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina 27599; †Center for Pharmacogenetics, School of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pennsylvania 15213

王均　译



## 摘要

基因治疗研究的核心在于合适传输体系的研发。尽管目前大多数临床实验使用的都是病毒载体体系，但是，阳离子脂质体由于其具有安全性以及多样性的特点，使其成为具有广泛应用前景的基因载体（Pedroso de Lima et al. 2001）。病毒载体可能引起遗传突变以及癌变，并且重复注射病毒载体将诱导免疫反应，削弱转基因的表达（Liu and Huang 2002）。正是由于病毒载体这方面的局限性，使得阳离子脂质体显示出抢眼的优势。虽然阳离子脂质体在转染效率方面比病毒载体要差，但是由于其具有安全性、多样性、容易制备、低免疫原性，以及良好的生物相容性的优点，使其无论在实验室还是在临床试验上都得到了广泛应用。

## 引言

lipoplex 是阳离子脂质体和 DNA 的复合物，通过带负电荷的核酸和带正电荷的阳离子脂质体的相互作用而形成。实验室制备浓缩的分散均匀的脂质体十分方便快捷，只需要在玻璃管底部沉积脂质薄层，经水化，然后用特定孔径的聚碳酸酯薄膜滤器挤压过滤即可得到。lipoplex 在非病毒基因载体中应用最为广泛。然而，阳离子脂质体，特别是由单价阳离子脂质材料组成的阳离子脂质体，不能有效结合 DNA，使得阳离子脂质体与 DNA 的复合物的粒径过度分散（300～2000nm 以上）（Pedroso de Lima et

al. 2001)。鉴于基因传输载体应具备小体积，且应该结合 DNA 的特性，我们设计了一种基于脂质体-聚阳离子-DNA（LPD）纳米颗粒（Gao and Huang 1996；Li and Huang 1997）。这种 LPD 纳米颗粒包含高度凝聚的 DNA，外围是脂质双分子层，平均粒径在 100nm 左右（图 1）。

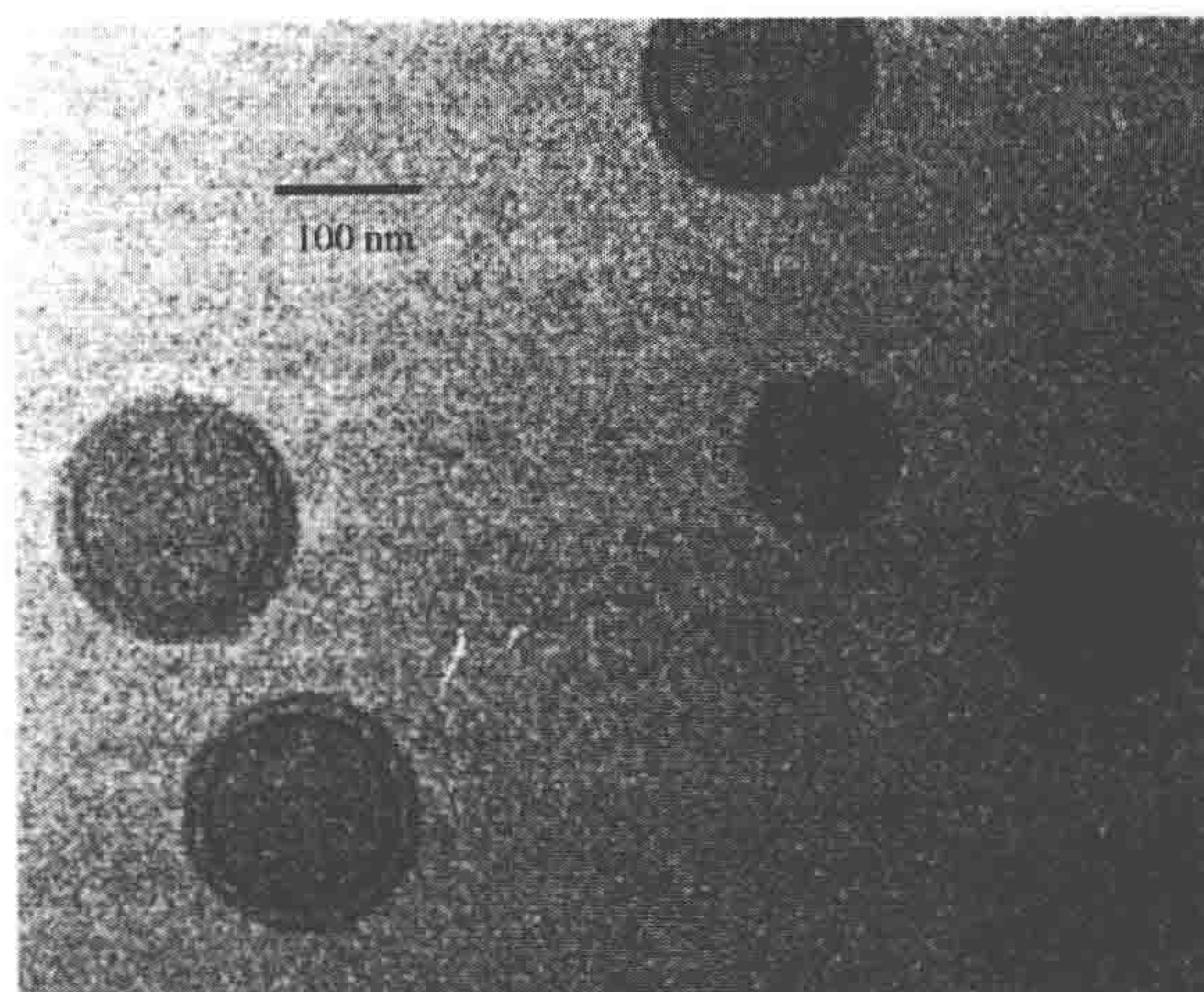



图 1. LPD 的冷冻电子显微镜图。

LPD 纳米颗粒常规用于全身注射。小鼠经 LPD 纳米颗粒全身注射后，在包括心脏、肺、肝脏、脾脏和肾脏等主要器官中都能有效表达转入的基因（图 2）。例如，小鼠接受尾静脉注射后 10min，30％～40％的注射质粒 DNA 分布在肺脏，35％～45％分布在肝脏（Zhang et al. 2005）。lipoplex 和 LPD 表面的正电性特征是主要分布在肺的主要原因，而肺恰好是它们经静脉注射后面临的第一个脏器。最高的转基因活性主要集中

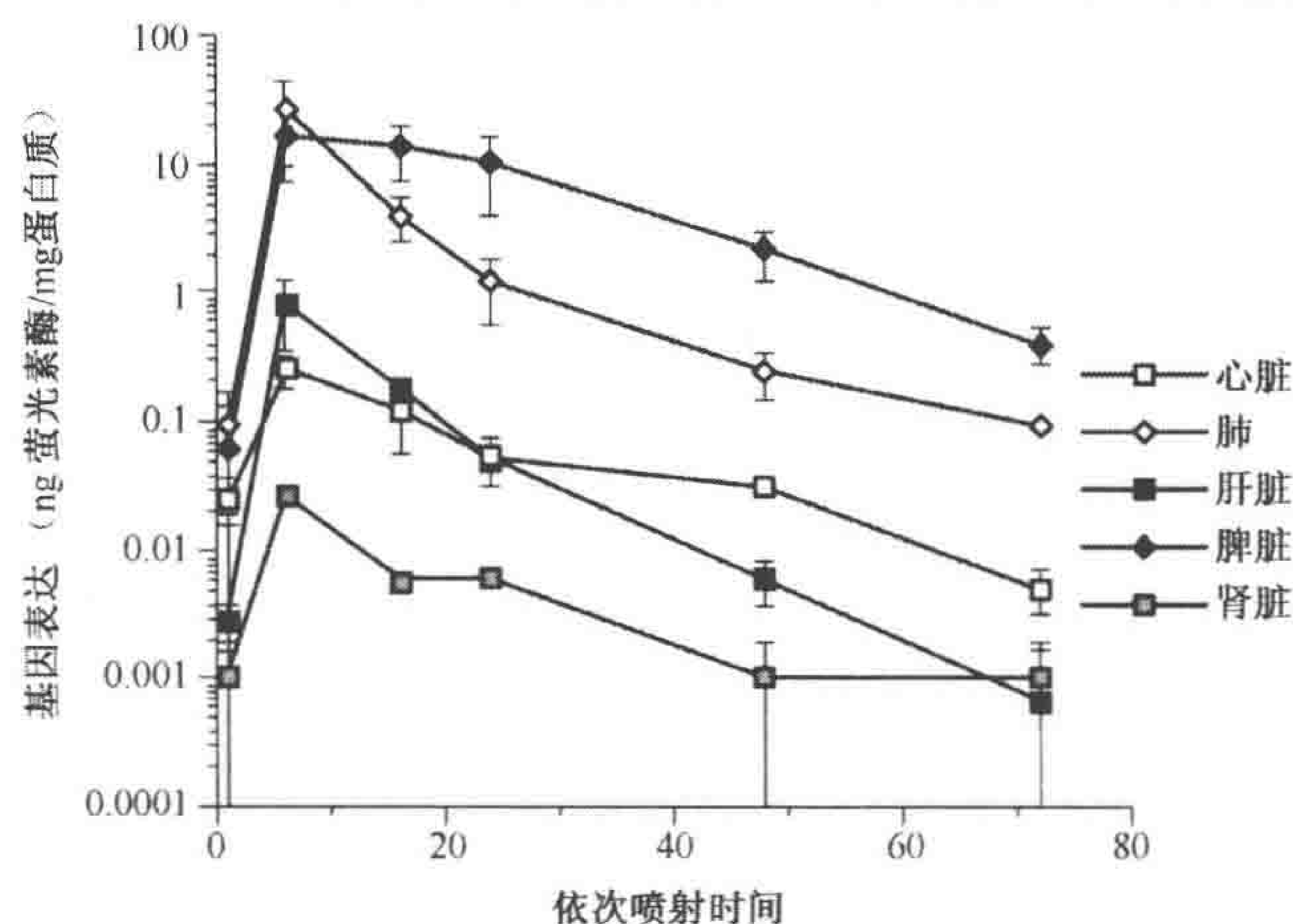



图 2. 随着时间的延长，体内 LPD 基因的表达。按照一只小鼠 50μg 质粒 DNA（pCMVLacZ）的剂量注射 LPD。注射后的不同时间，将小鼠处死，检测基因在主要器官的表达（经允许引自 Li and Huang 1997）。

在肺上皮细胞（Li and Huang 1997）。也正是因为肺是转基因表达的主要器官，lipoplex 通常被用来治疗肺部疾病，如肺部肿瘤转移（Sakurai et al. 2003）和囊性纤维性病变（Dass 2004）。此外，当用 LPD 输送肿瘤抑制基因 Rb 时，在 Rb（+/−）小鼠（这种小鼠能够在脑垂体自发形成肿瘤继而转移到肺部）的肺部 Rb 基因得到有效表达。重复注射导致转移肿瘤细胞自发凋亡，而且肺部肿瘤转移因此被抑制（Nikitin et al. 1999）

本章描述这些体系的制备过程，物理性能以及生物活性。

# 方案

## LPD 纳米颗粒的制备和输送

阳离子脂质体和 DNA 混合形成 lipoplex，紧接着装载到 LPD 纳米颗粒。纳米颗粒注射到小鼠体内后，表达蛋白质并用合适的方法检测蛋白质的表达。

### 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

5×葡萄糖水溶液（26% *m*/*V*），无菌

将 13g 葡萄糖溶解在大约 40ml 灭菌水中，然后用灭菌水将体积调到 50ml，用 0.2μm 滤器过滤，室温可保存一年。

DOTAP（25mg/ml 的储液），溶解于氯仿中＜！＞（Avanti Polar Lipids）

DOTAP（1，2-二油酰基-3-三甲基氨基丙烷）是最为广泛使用的用于基因传递的阳离子脂质材料之一。一些电中性脂质材料（如 DOPE、1，2-二油酰磷脂酰乙醇胺、胆固醇）可以用于提高转基因效率。

胆固醇的氯仿溶液（20mg/ml）（Sigma-Aldrich）

体内使用时，胆固醇可以替换 DOPE，作为辅助脂，生成更为稳定有效的阳离子脂质体（Li et al. 1998）。

溶解于去离子水的质粒 DNA（1mg/ml）

质粒 DNA 应该经高度纯化并且不含内毒素。推荐用水或 5.2% 的葡萄糖溶液稀释 DNA，因为盐干扰 DNA 和阳离子脂质体的相互作用，并发生团聚。

硫酸鱼精蛋白（10mg/ml，Elkins-Sinn）

硫酸鱼精蛋白（MW 4000～4250），富含精氨酸的阳离子多肽，在 LPD 中用于和 DNA 相互作用。1mol 硫酸鱼精蛋白含有 21mol 正电荷，与 DNA 分子具有很强的相互作用。

灭菌水

121℃蒸汽灭菌 30min。

#### 仪器

超声水浴

Corex 玻璃试管（30ml）
LiposoFast 挤压器，带 1ml 注射器（Avestin）
氮气（$N_2$）钢瓶
聚碳酸酯薄膜滤器（1.0μm、0.4μm 和 0.1μm，Corning 公司）
聚乙烯离心管（50ml）
真空干燥器

## 方法

### 阳离子脂质体的制备

1. 用氯仿将 30ml Corex 玻璃试管冲洗 3 次。

   残余氯仿可以不吹干。

2. 在玻璃管中将 0.8ml DOTAP 储液和 0.55ml 的胆固醇储液混合。

   目前，我们实验室按摩尔比 1∶1 混合 DOTAP 和胆固醇制备阳离子脂质体。由 1μg 的质粒 DNA 和含 36nmol DOTAP 和 36nmol 胆固醇的阳离子脂质体制备的 lipoplex 的电荷比为 12∶1（+∶−）。

3. 在化学通风橱里，转动玻璃管的情况下，沿管壁导入氮气，使得氯仿挥发，并在玻璃管底部形成一层薄膜。可将玻璃管置入 35℃水浴，以加速该过程。
4. 将玻璃管置于真空干燥器 2～3h 使其完全干燥。为防止脂质膜在真空环境下损失，可用铝箔盖上玻璃管，同时用针头在箔片上刺一些小孔。
5. 在玻璃管中加入 2ml 灭菌水。
6. 以最大速度涡旋 15s 以重悬脂质，直到管壁没有脂质残留，也没有白色沉淀为止。

   重悬浮时，可将玻璃管在超声水浴中间断超声几次（10～15s）。

7. 将重悬液于室温下放置 2～3h 或者 4℃过夜培养，使得脂质完全水化。

   水化时间越长，脂质体越容易被挤出。推荐过夜水化。

8. 涡旋悬浮液，并在 65℃水浴中培养 5～10min。如果观察到脂质聚集，要将重悬液置于超声水浴超声处理直到聚集消失，然后重新放回水浴中。
9. 将两张 1.0μm 的聚碳酸酯膜放在挤出机里。
10. 将挤出机加热到 65℃，维持 5min。

    加热脂质悬浮液和挤出机到 65℃，是为了维持脂质液态，方便挤出并提高脂质混合的效率。

11. 将悬浮液通过滤膜挤出，重复 5 次。把挤出机放回水浴中。

    悬浮液经挤出后，从混浊变成半透明状。

12. 连续使用 0.4μm 和 0.1μm 的聚碳酸酯滤膜重复步骤 9～11，获得平均粒径在 100～200nm 的脂质体。

    阳离子脂质体悬液在 4℃可以稳定存在几个月。

### lipoplex 的制备

13. 在 50ml 离心管内加入 60μl 5×葡萄糖溶液、154μl 灭菌水和 86μl 的阳离子脂质体，

中速涡旋 10s。

脂质体和质粒 DNA 在温和条件下混合以得到脂质复合物。终体积 600μl 的溶液中含 100μg 质粒 DNA。需要大量制备时，体积和质量按比例加大。

14. 在 1.5ml 离心管中加入 40μl 5×葡萄糖溶液、60μl 灭菌水和 100μl 质粒 DNA，轻拍离心管以混合。不要涡旋。
15. 在轻轻涡旋稀释脂质体悬液的同时，逐滴加入稀释的 DNA 溶液。用 1000μl 移液器枪头转移液体；加入 200μl DNA 溶液需要 5～10s。
16. 注射前，室温下培养复合物 10～15min。

## LPD 的制备

17. 在 50ml 离心管内加入 60μl 5×葡萄糖溶液、148μl 灭菌水和 86μl 的阳离子脂质体，和 6μl 硫酸鱼精蛋白溶液，中速涡旋 10s。

    LPD 纳米颗粒的最佳组分是 12nmol 的 DOTAP/12nmol 胆固醇/0.6μg 硫酸鱼精蛋白/1μg 质粒 DNA，DOTAP 和 DNA 的电荷比是 4∶1，鱼精蛋白和 DNA 的电荷比是 1∶1。

18. 在 1.5ml 离心管中加入 40μl 5×葡萄糖溶液、60μl 灭菌水和 100μl 质粒 DNA，轻拍离心管以混合。不要涡旋。
19. 在轻轻涡旋稀释脂质体 鱼精蛋白溶液的同时，逐滴缓慢加入稀释的 DNA 溶液。

    用 1000μl 移液器枪头转移液体；加入 200μl DNA 溶液需要 5～10s。LPD 纳米颗粒通常在使用前即时准备。然而，在 4℃条件下 LPD 至少可以储藏 4 周，而不影响活力。LPD 也可以冻干成粉末，并在室温条件下至少可以储藏一年，重悬后活力不降低（Li et al. 2000）。

20. 将 LPD 在室温培育 10～15min 后注射到动物合适的部位。
21. 用合适的方法检测 DNA 的表达。

## 疑难解答

问题（步骤 15）：混合中出现白色、串状沉淀。

解决方法：沉淀的形成一般是因为溶液中含盐（如 TE、NaCl 等）。静脉注射以后，沉淀对小鼠有一定的毒性。使用合适的混合容器，逐滴加入，慢慢混旋混合液可以避免沉淀的产生。如果产生沉淀，需要重新制备混合物。经常练习，可以避免沉淀的产生。注意：不能涡旋 DNA 或者复合物。

问题：（步骤 20）：提高输送基因到肺的转染效率。

解决方法：LPD 和 lipoplex 的转染效率受电荷比的影响。过量的正电荷能提高在肺里的转染效率。因此在实际操作中可以根据要求改变电荷比。对于 lipoplex，可用不同量的脂质体和 DNA 混合，但对于 LPD，鱼精蛋白与 DNA 的电荷比固定在 1∶1 是最佳的选择（Li and Huang 1997）。我们建议保持鱼精蛋白与 DNA 的比例，而改变脂质体的用量，来改变电荷比。电荷比可以根据每个组分带电量计算：1nmol 的 DOTAP 和硫酸鱼精蛋白分别带有 1nmol 和 21nmol 的正电荷，胆固醇是电中性的；1μg 的 DNA 带有 3.1nmol 的负

电荷。

问题（步骤 21）：使用这种方法传输基因时的毒性甚至死亡问题。

解决方法：全身性的注射 lipoplex 快速诱导血液中产生促炎性细胞激素，包括 TNF-α、IL-12 和 IFN-γ（Scheule et al. 1997）。当注射剂量较高时（4mg 质粒 DNA/kg 体重），经常致死。降低 DNA 的剂量可以减少死亡率，但同时也造成基因表达效率的降低。研究表明质粒 DNA 中未被甲基化的 CpG 序列与刺激免疫应答有关（Krieg et al. 1995）。LPD 的毒性类似于 lipoplex。解决这个问题的办法包括修饰质粒 DNA 减少 CpG 序列（Yew et al. 2000）、用 PCR 扩增短的 DNA 片段代替完整的质粒 DNA（Hofman et al. 2001）、使用免疫抑制剂如地塞米松（Liu et al. 2004）和 NF-κB 诱骗寡核苷酸（Tan et al. 1990）等。

## 致谢

上述工作由美国国立卫生研究院提供资助（AI-48851、DK-54225、CA-74918 和 AR-45925 资助 L. H.，HL-63080 资助 S. L.）。

## 参考文献

Dass C.R. 2004. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: Factors affecting in vivo transfection. *J. Mol. Med.* **82:** 579–591.

Gao X. and Huang L. 1996. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* **35:** 1027–1036.

Hofman C.R., Dileo J.P., Li Z., Li S., and Huang L. 2001. Efficient in vivo gene transfer by PCR amplified fragment with reduced inflammatory activity. *Gene Ther.* **8:** 71–74.

Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374:** 546–549.

Li B., Li S., Tan Y., Stolz D.B., Watkins S.C., Block L.H., and Huang L. 2000. Lyophilization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *J. Pharm. Sci.* **89:** 355–364.

Li S. and Huang L. 1997. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther.* **4:** 891–900.

Li S., Rizzo M.A., Bhattacharya S., and Huang L. 1998. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther.* **5:** 930–937.

Liu F. and Huang L. 2002. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control. Release* **78:** 259–266.

Liu F., Shollenberger L.M., and Huang L. 2004. Non-immunostimulatory nonviral vectors. *FASEB J.* **18:** 1779–1781.

Nikitin A.Y., Juárez-Párez M.I., Li S., Huang L., and Lee W.H. 1999. RB-mediated suppression of spontaneous multiple neuroendocrine neoplasia and lung metastases in $Rb^{+/-}$ mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 3916–3921.

Pedroso de Lima M.C., Simões S., Pires P., Faneca H., and DüzgünesN. 2001. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: From biophysics to biological applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **47:** 277–294.

Sakurai F., Terada T., Maruyama M., Watanabe Y., Yamashita F., Takakura Y., and Hashida M. 2003. Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-β gene and poly I: Poly C in a murine lung metastasis model. *Cancer Gene Ther.* **10:** 661–668.

Scheule R.K., St George J.A., Bagley R.G., Marshall J., Kaplan J.M., Akita G.Y., Wang K.X., Lee E.R., Harris D.J., Jiang C., Yew N.S., Smith A.E., and Cheng S.H. 1997. Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. *Hum. Gene Ther.* **8:** 689–707.

Tan Y., Li S., Pitt B.R., and Huang L. 1999. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* **10:** 2153–2161.

Tousignant J.D., Gates A.L., Ingram L.A., Johnson C.L., Nietupski J.B., Cheng S.H., Eastman S.J., and Scheule R.K. 2000. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* **11:** 2493–2513.

Yew N.S., Zhao H., Wu I.H., Song A., Tousignant J.D., Przybylska M., and Cheng S.H. 2000. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol. Ther.* **1:** 255–262.

Zhang J.S., Liu F., and Huang L. 2005. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv. Drug Del. Rev.* **57:** 689–698.

# 第四十章　用于系统传递基因的靶向电中性脂质囊泡

Weijun Li 和 Francis C. Szoka, Jr

Department of Biopharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of California at San Francisco, California 94143-0446

王均　译



## 摘要

本章描述纳米脂质颗粒（NLP）包封核酸的详细实验步骤。这种 NLP 带有聚乙二醇（PEG）屏蔽层，并含有生物敏感脂质和配体，用于实施 DNA 的靶向输送。与传统的阳离子脂质-DNA 复合物（lipoplex）不同，上述 NLP 通过乙醇透析法获得，并在围绕 DNA 分子的脂质双分子层中掺入了 PEG 化脂质，颗粒直径小于 100nm。PEG 化脂质主要用来保持纳米粒的稳定性，并延长其在体内血液循环中的滞留时间。如果在 NLP 中掺入对低 pH 敏感的 PEG 化脂质，有助于 PEG 链在具有较低 pH 的内含体/溶酶体中的断裂。掺入含有二硫键的阳离子脂质材料可以通过硫醇与二硫键的相互转换反应调节 NLP 的表面电荷性能，使其从表面带正电荷转变成电中性，乃至表面带负电荷。通过胶束材料的交换在 NLP 表面插入带有特定配体的脂质材料，可以提高细胞对颗粒的识别能力。上述制备方法采取连续的组装方式，在全身性基因治疗上具有以下优势：①纳米颗粒的直径小于 100nm，表面为电中性，同时具有 PEG 隐蔽层，有助于延长其在体内的循环时间；②对低 pH 环境敏感的脂质有助于促进 DNA 的释放并提高 DNA 从内含体逃逸的能力；③通过 NLP 表面配体的识别，可以在体内实施对特定组织或细胞的靶向输送。

## 引言

脂质纳米颗粒在过去的 10 年中作为全身性基因治疗的载体得到了广泛研究。当前

学者们正致力于研究一些基因药物，用来治疗包括癌症和炎症在内的获得性疾病，这需要利用可以全身性（静脉）给药来输送基因药物到达病灶部位的载体（Mahato and Kim 2002）。阳离子脂质体是体外基因转染最有效的试剂之一，将它和DNA混合，可以包裹DNA，形成阳离子脂质-DNA复合体（lipoplex），能保护DNA避免被酶降解，同时通过和带负电的细胞膜相互作用将DNA输送到细胞内。不幸的是，如通过静脉注射，lipoplex的阳离子性表面同样介导与血浆蛋白质以及很多组织的细胞糖被的强烈相互作用（Duzgunes 2003），导致其被网状内皮系统（RES）快速地从血流中清除（半衰期$<$5min）（Barron and Szoka 1999），直接造成不良炎症反应，到达目标组织的药物剂量也大大降低。

为了克服阳离子脂质诱导的毒性，并延长其体内循环时间，研究人员用去垢剂透析法（detergent dialysis）将DNA包封到PEG隐形的阳离子脂质体中（Wheeler et al. 1999；Zhang et al. 1999；Harvie et al. 2000；Choi et al. 2003；Li et al. 2005）。最近，也有研究人员采用乙醇透析法（Jeffs et al. 2005）。PEG隐形的阳离子纳米粒与lipoplex不同，它在核酸分子周围形成双分子层的壳，粒径更小（$<$100nm），在体内更加稳定。这些特性帮助延长颗粒在体内的循环时间（半衰期1～10h），并提高了到达靶部位的药物比例。虽然在肿瘤中用这种PEG隐形的纳米粒来进行基因转染的效率相对较低，但和报告基因在其他组织中的表达量相比要高出两个数量级（Fenske et al. 2001）。

PEG“外衣”有助于延长循环时间，但却妨碍了细胞的摄取和随后DNA从内含体的逃逸。这样，在细胞培养中使用含有PEG“外衣”隐形的纳米粒作为载体时，DNA的转染效率要比阳离子的lipoplex低几个数量级（Fenske et al. 2005）。纳米粒到达靶细胞表面后，如果能去除其PEG包覆层，使它暴露出阳离子表面，将大大提高基因转染的效率。基于此设想，我们设计了一种对酸不稳定的PODS，在PEG单甲醚和二硬脂酰甘油之间插入对酸不稳定的二元酸酯键。在碱性环境，PODS嵌合进阳离子脂质体的过程是稳定的，但在内含体的低pH环境下二元酸酯键发生水解，使得PEG从颗粒释放生成阳离子性颗粒（Guo and Szoka 2001；Choi et al. 2003；Li et al. 2005）。通过去垢剂透析法，我们用PODS制备了对低pH敏感、具有PEG隐蔽层且包含DNA的纳米脂质颗粒（NLP），这种NLP与对pH不敏感的PEG隐形NLP相比，表现出更高的转染效率（Li et al. 2005）。

PEG隐形的pH敏感阳离子NLP的表面特性可以进一步通过二硫键相互转换的方法来修饰，以赋予它电中性或者带负电的表面（Huang et al. 2005）。在上述方法中，用于DNA包封的PEG隐形NLP的阳离子脂质的阳离子头部和脂质锚定部分由二硫键连接，而二硫键可以被其他的硫醇化合物还原断裂。类似的，许多含巯基的阳离子通过和各种交联剂联接，也可以达到同样的目的（Guo and Szoka 2003）。在本实验程序中，我们使用了一种在碱性环境下对还原剂比较敏感的阳离子型巯基化胆固醇的衍生物（TCL）（图1）。诸如半胱氨酸和谷胱甘肽这样的还原剂可以改变颗粒的表面电性能，使其表面从带正电荷转变成电中性，甚至带负电荷。当这种NLP被注射进动物体内后，它的电中性表面可以延长它在血液中的循环时间。

为了进一步提高包载DNA颗粒在体内的基因转染效率，可以在NLP表面连接一些配体，以增加那些能表达出相应受体的细胞对这些颗粒的摄取。举例来说，TAT多

肽作为一种非特异性的配体，通常作为模型配体来阐释如何通过“胶束转换”这种方法来将配体插入 NLP 表面（Uster et al. 1996；Huang et al. 2005）。

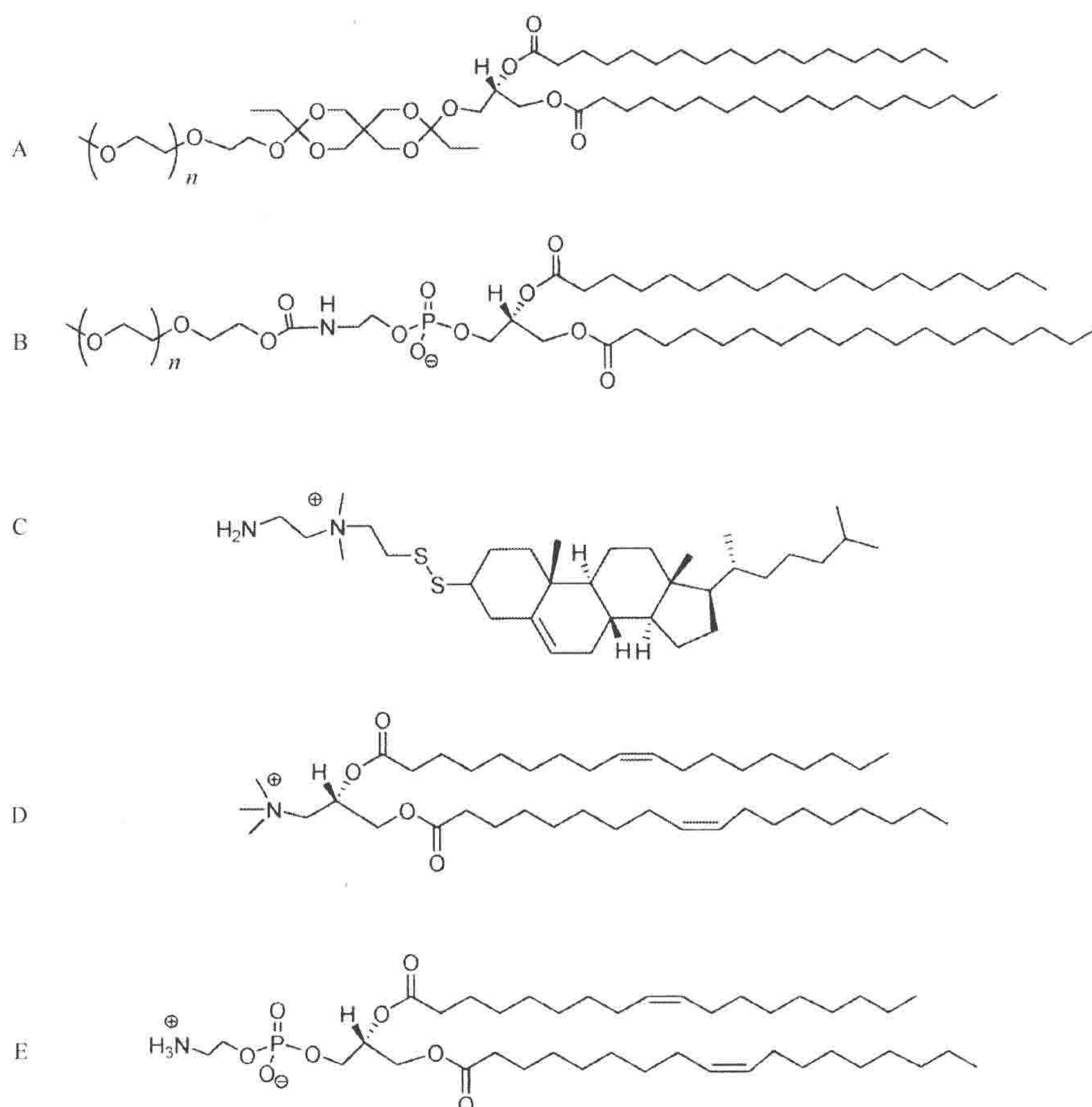



图 1. 用于纳米脂质颗粒（NLP）制备的典型脂质材料。按照结构的不同可以分为三类：①PEG 化脂质，如低 pH 敏感的 PEG 化脂质 PODS（A）或对 pH 不敏感的脂质如 PEG-DSPE（B）；②阳离子脂质，如对还原剂敏感的脂质 TCL（C）或对还原剂不敏感的二酰基阳离子脂质 DOTAP（D）；③辅助脂质，如 DOPE（E）。

随后的实验程序介绍通过连续操作的制备方法加入一些特别组分，来制备生物敏感、具有靶向性的电中性脂质纳米颗粒。首先，使用可被还原的阳离子脂质和 PEG 化脂质高效包封 DNA 制备 NLP，同时除掉未被包封的游离 DNA。然后，通过二硫键交换反应去掉阳离子头部。最后，连接在脂质的配体以胶束形式加入到体系，并嵌入到颗粒中。这里将装配上述颗粒的三个步骤总结如下：

- **乙醇透析法制备包载 DNA 的 PEG 隐形 NLP**：去垢剂透析法或者乙醇透析法均可用于制备上述颗粒。出于经济和容易放大的考虑，建议使用后者。将 PEG 化脂质，阳离子脂质和辅助脂质一起溶解在 50％的乙醇溶液中，同时将 DNA 也溶解在另一份 50％的乙醇溶液中。将这两种组分混合，形成脂质/DNA 中间体。

乙醇经透析除去后，获得稳定的 NLP。这种方法同样适用于小干扰 RNA (siRNA)或反义寡核苷酸。

- **用还原剂对 NLP 进行表面修饰**：如果在上一步中使用 TCL 作为阳离子脂质，可以通过两性离子型半胱氨酸还原剂处理将 NLP 的表面电荷从正电性转换成电中性。操作中将半胱氨酸按与 TCL 脂质的摩尔比为 10：1 的比例加入到 NLP 中，使 TCL 的头部转变成半胱氨酸残基。如果需要 NLP 的表面电荷是电负性，则可以加入阴离子型还原剂（如谷胱甘肽）。过量的还原剂可以通过透析除去。
- **利用胶束转换法插入配体到 NLP 表面**：配体分子经常通过 PEG 手臂连接在脂质亲水头部，也就是"配体-PEG-脂质"这种连接体。制备这种"配体-PEG-脂质"连接体的方法在别处有详细的描述（Hermanson 1996）。这种"配体-PEG-脂质"的结构中具有很大的亲水性头部，通常在水溶液中形成胶束。将这种"配体-PEG-脂质"胶束与脂质体或脂质体类似颗粒一起充分混合，它将插入到颗粒表面（Uster et al. 1996）。如果将这两者在高温（约 55℃）中培育超过 1h，则插入的效率将大于 90%。

特别要强调的是，颗粒的尺寸、稳定性以及转染效率依赖于所使用的脂质材料和（或）配体的物理化学性质。如果使用的脂质性质不同于这个实验中所列的脂质材料，那么对实验设计的进一步优化是有必要的。优化的方法包括改变脂质的组成比例、浓度和阳离子脂质/DNA 的电荷比（阳离子电荷的总量和 DNA 磷酸根的摩尔比）等。

# 方案

## 纳米脂颗粒的制备

用乙醇透析法把 DNA 包封进 PEG 隐形阳离子脂质体双分子层，来制备纳米脂颗粒。颗粒的表面电荷（阳离子头部）通过二硫键交换反应反转，使用还原剂使其从正电性转变成电中性，或者使用阴离子型还原剂使其转换到电负性。特异性配体可以通过胶束交换插入到颗粒的表面，以提高靶细胞对其的特异性摄取。

### 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

阳离子脂质（5mg/ml）

阳离子脂质可以是对还原剂敏感的脂质，如 TCL，或者是对还原剂不敏感的脂质，如 1，2-二油酰基-3-三甲基胺丙烷（DOTAP）（图 1D）。TCL 脂质：(2-氨乙基)-二甲基-(2-[3-胆固醇二硫乙基胺]）溴化铵盐酸盐参照文献方法合成（Huang et al. 2005），溶于甲醇/氯仿（1：1，*V*/*V*）中，制备 5mg/ml 的储存液。DOTAP（Avanti Polar Lipids [Alabaster，Alabama]）溶于氯仿，制备 5mg/ml 的储存液。

氯仿<！>

乙醇

辅助脂质（10mg/ml）

膜融合脂质 1，2-二油酰基-*sn*-甘油基-3-磷酯酰乙醇胺（DOPE）（图 1E）是广泛使用的能促进基因转染效率的辅助脂质。DOPE（Avanti Polar Lipids）具有相对较小的亲水头部，相信可以诱导细胞膜融合，从而在基因传递的过程中帮助 DNA 从内含体逃逸进入细胞质。DOPE 可以溶解于氯仿中，制备5mg/ml的储存液。

配体-PEG 脂质（0.05mmol/L）

TAT 多肽的序列是 CGGGRKKRRQRRRGYG。它可以通过 N 端半胱氨酸残基连接到马来酰亚胺官能化的 PEG 脂质：1，2-二硬脂酰基-*sn*-甘油基-3-磷酯酰乙醇胺-*N*-马来酰亚胺（聚乙二醇）2000（Avanti Polar Lipids）制备“TAT -PEG-脂质”。要了解更多的化学反应，请查阅参考文献 Hermanson，（1996）。“TAT -PEG-脂质”可以溶解于甲醇/氯仿（1∶1，*V*/*V*）溶液，制备 0.05mmol/L 的储存液。其他配体-PEG 脂质可替代“TAT -PEG-脂质”使用。

哺乳动物细胞（处于指数增长期）

小鼠（雌性，6～8 周龄）

甲醇

PEG 化脂质（10mg/ml）

PEG 化脂质既可以是对低 pH 敏感的脂质，如 PODS（图 1A），也可以是对 pH 不敏感的脂质，如 PEG-1，2-二硬脂酰基-*sn*-甘油基-3-磷酯酰乙醇胺（PEG-DSPE）（图 1B）。PODS 的合成方法可以参照文献 Guo et al.（2004）。PEG-DSPE 可以从 Avanti Polar Lipids 公司购买。PEG 化脂质的 PEG 链段分子质量为 2000。这些 PEG 化脂质可以 10mg/ml 的浓度溶解在氯仿中。

质粒 DNA（Advysis 或其他的基因载体生产商）

实验室提纯质粒 DNA，推荐使用商业 DNA 纯化试剂盒纯化。

siRNA 或寡核苷酸（Invitrogen 或其他寡核苷酸生产商）

10×Tris 缓冲液（50mmol/L，pH 7.4 或 8.5）

pH 7.4 缓冲液用于制备含有对 pH 不敏感 PEG 脂质的 NLP，而 pH 8.5 缓冲液用于制备含对低 pH 敏感性的 PEG 脂质（PODS）的 NLP。使用前将 10×Tris 缓冲液稀释成 1×缓冲液。预留 5ml 1×Tris 缓冲液（用孔径 0.22μm 的滤膜过滤）悬浮脂质和溶解 DNA。

10×Tris 缓冲生理盐水（TBS）（pH 7.4 或 8.5）

50mmol/L Tris

1.5mol/L NaCl

调节 pH 到 7.4 或 8.5。pH 7.4 缓冲液用于制备含有对 pH 不敏感 PEG 脂质的 NLP，而 pH 8.5 缓冲液用于制备含对低 pH 敏感性的 PEG 脂质（PODS）的 NLP。使用前稀释成 1×缓冲液。

## 仪器

透析装置（Pierce）

透析装置包括一个截留分子质量 10 000 的 Slide-A-Lyzer 透析管和一个浮盖。

恒温水浴（55℃）

旋转蒸发仪（Brinkmann Instrument）

脂质干燥装置是用来除掉脂质混合物中的大量溶剂，以及用来在玻璃表面沉积脂质薄膜。脂质薄膜沉积到耐真空玻璃圆底烧瓶（300ml）中，干燥至少 3h，以除去薄膜中痕量的有机溶剂。

无菌注射器（3ml）和针头（18G 1.5）（Beckon Dickinson）

## 方法

### 乙醇透析法包载核酸到 NLP

1. 从储存液中吸取 PEG 化脂质、阳离子脂质和 DOPE，置于带螺帽的 16mm×100mm 玻璃管（使用前要清洗及灭菌）中充分混合，减压下使用旋转蒸发仪干燥除去溶剂。随后将此含有脂质薄膜的玻璃管在更高真空下干燥至少 3h，最好是干燥过夜。典型的制备含 20μmol 总脂质，其中脂质摩尔比例是：PEG 化脂质∶阳离子脂质∶辅助脂质＝10∶50∶40 或者 10∶30∶60。

   使用玻璃移液管量取和转移溶于有机溶剂中的脂质。每次操作以后，必须马上用聚四氟乙烯带密封脂质储存液，并储藏在－20℃。如果样品中同时含有 TCL 和 PODS，为避免 PODS 在干燥过程中发生降解，应在加入 PODS 之前先在脂质混合液中加入吗啉（与 TCL 的摩尔比为 20∶1）。

2. 将干燥后的脂质溶解于无水乙醇 30min，再用移液管加入 0.5ml 1×Tris 缓冲液，迅速用最大速度涡旋 2min，以形成脂质单相溶液（溶液 A）。

   如果要加速脂质在乙醇中的分散，可以在混合 Tris 缓冲液之前，在氩气保护下将含有 TCL 的脂质混合液于约 65℃下加热 0.5min，然后室温下自然冷却 5min。部分脂质在冷的乙醇中沉淀下来是比较常见的现象。

3. 溶解 1.100mg 核酸（质粒 DNA 或其他寡核苷酸）于 0.5ml 1×Tris 缓冲液和 0.5ml 乙醇的混合液中（溶液 B）。

   在样品的制备过程中，拧紧溶液 A 和溶液 B 的盖子，以减少乙醇的挥发。

4. 典型的制备方法是，在 1s 内用带 18 G1.5 针头的 3ml 注射器将 DNA 溶液（溶液 B）注射到脂质溶液（溶液 A）中。为了使其充分乳化，在 15s 内用注射器反复吸取和吹打混合溶液 10 次，再用最大速度将混合溶液涡旋 30s。

5. 用带 18G 1.5 针头的 3ml 注射器将脂质-DNA 混合溶液转移到 Slide-A-Lyzer 透析管中。用 1L 的 1×Tris 缓冲液在 4℃下透析 2d，期间 4 次更换透析缓冲液。

   在使用之前把透析管浸没在透析缓冲液中，保持 30s，让其充分水和。要特别注意的是在转移溶液的过程中不要让针头碰到透析膜。

6. 更换透析缓冲液，用 1L 1×TBS 缓冲液替代 1×Tris 缓冲液，在 4℃下继续透析过夜。

   1×TBS 缓冲液中含有 150mmol/L 的 NaCl，比低离子强度的 1×Tris 缓冲液更适合体内给药。

7. 用带 18G 1.5 针头的 3ml 注射器将 NLP 样品从透析管中吸取，转移到有螺帽的灭菌管中，并储存在 4℃。

### 通过二硫键交换反应对 NLP 表面进行修饰

8. 还原试剂现配现用。用纯水或 pH 为 8.5 的 1×TBS 缓冲液（对于含有 PODS 的样

品）制备0.1～0.2mol/L的半胱氨酸溶液。

9. 按摩尔比为10∶1（10倍NLP中TCL的量）的比例在NLP溶液（步骤7）中加入还原试剂。涡旋混合10s，室温下放置5min，然后将样品转移到透析管中，迅速用1L 1×TBS缓冲液4℃透析1d除去过量的还原试剂，其间更换一次透析缓冲液。

### 在NLP表面插入“配体-PEG-脂质”

10. 先确定TAT多肽-PEG-脂质的量，它的量等于NLP脂质总量的0.3%。转移含上述量的TAT肽-PEG-脂质储存液到16mm×100mm带有螺帽的灭菌玻璃管中。在减压下旋转蒸发除去有机溶剂，然后高真空下干燥过夜。

11. 在室温下直接用NLP溶液将TAT-PEG-DPPE脂质薄膜水化作用10min，然后在55℃水浴中培育1h。确定在操作中，螺帽密封之前充氩气或者氮气。在培育过程中，每隔10min将玻璃管取出涡旋10s。

    这些处理方法会使TAT-PEG脂质通过胶束转换作用从玻璃表面转移到NLP中。参照步骤12～13进行体外转染实验；体内转染实验，请参照步骤14～15。

### 体外基因转染

12. 进行体外转染实验之前，在24孔板中用含有10%胎牛血清的完全培养基培养哺乳动物细胞过夜，如CV-1细胞，以每孔$1\times10^5$个细胞的密度种植。

13. 更换培养基，在孔中加入包封了2μg DNA的NLP，培养4～48h（期间培养基可以更换也可以不更换）。用适当的方法检测细胞合成的相应蛋白质。

    对于siRNA或者反义寡核苷酸样品，用包封了对照序列的NLP作对照，分析基因敲出的效率。

### 体内基因转染

14. 从小鼠的尾静脉注射小体积（约200μl）包封10～50μg DNA或其他寡核苷酸的NLP。

15. 在合适的时间（如24h或者48h），将动物处死，用适当的方法检测靶组织中的基因转染效率。

    例如，检测不同器官中萤光素酶基因的转染：

    i. 处死动物，取出器官（如肝脏、脾脏、肺或心脏），用冷的磷酸盐缓冲液进行清洗。
    ii. 切取并转移200mg组织，置于含1g Zircon Beads（直径2.4mm，Biospec产品）和1ml 1×Reporter裂解缓冲液（Promega）的离心管中。
    iii. 用Mini-Beadbeater（Biospec产品）以5000 beating rate/min下匀浆30s捣碎组织。
    iv. 离心样品，取10μl上清，加入100μl萤光素酶检测溶液，依试剂盒说明来检测活力。

## 疑难解答

### 其他试剂和仪器

PicoGreen染料（P7581；Molecular Probes，Inc.）

Malvern Zeta 3000动态光散射仪器（Malvern Instruments Ltd.，Worcestershire，U. K.）

荧光光度计（激发波长：490nm；发射波长：515nm；如 Quantech 荧光光度计，Barnstead/Thermolyne，Dubuque，Iowa）

问题：DNA 包封效率。

解决方法：通过检测 DNA 与 PicoGreen 的反应测试包封效率。当 PicoGreen 加入到 DNA 溶液中后，它会嵌入到双螺旋 DNA 中，并在 515nm 处发出强烈的荧光信号。在没有 Triton X-100 的情况下 DNA 如果不和 PicoGreen 染料发生反应，可以认为 DNA 被包封在纳米颗粒。DNA 的包封效率可以依照下式计算：$I(\%) = (F^0 - F)/F^0 \times 100$，其中 $F^0$ 和 $F$ 分别是存在 0.4% Triton X-100 及没有 Triton X-100 情况下纳米颗粒与 PicoGreen 混合溶液的荧光值（Li et al. 2005）。

问题：NLP 尺寸和表面电荷测量。

解决方法：NLP 的平均直径和尺寸分布可以使用 Malvern Zeta 3000 动态光散射仪测量（Li et al. 2005）。Zeta 电势可以使用同一仪器在电泳模式测量，测量前用低盐缓冲液（1mmol/L NaCl 和 1mmol/L HEPES，pH 7.5）稀释 100 倍。

问题：NLP 样品与游离 DNA 的关系。

解决方法：NLP 样品中的游离 DNA 可以通过阴离子交换色谱法除去，阴离子交换柱填充 DEAE-琼脂糖 CL-6B 介质（Sigma-Aldrich）（直径 1cm，高 3cm）。在柱子中加入 1.0ml NLP，并用 10ml 150mmol/L NaCl、5mmol/L Tris 缓冲液（pH 7.4 或 8.5）来洗脱。结合在柱中的游离质粒 DNA 可以用 10ml 1mol/L NaCl、5mol/L Tris 缓冲液（pH 7.4 或 8.5）洗脱。每个组分取 0.5ml 测量 260nm 处的吸收值（Li et al. 2005）。

## 参考文献


Barron L.G. and Szoka F.C. 1999. The perplexing delivery mechanism of lipoplexes. In *Nonviral vectors for gene therapy* (ed. L. Huang et al.), pp. 229–266. Academic Press, San Diego, California.

Choi J.S., MacKay J.A., and Szoka F.C., Jr. 2003. Low-pH-sensitive PEG-stabilized plasmid-lipid nanoparticles: Preparation and characterization. *Bioconjug. Chem.* **14:** 420–429.

Duzgunes N., ed. 2003. Liposomes, Part C. *Methods Enzymol.*, vol. 373. Elsevier, New York.

Fenske D.B., MacLachlan I., and Cullis P.R. 2001. Long-circulating vectors for the systemic delivery of genes. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3:** 153–158.

Guo X. and Szoka F.C., Jr. 2001. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconjug. Chem.* **12:** 291–300.

———. 2003. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc. Chem. Res.* **36:** 335–341.

Guo X., Huang Z., and Szoka F.C. 2004. Improved preparation of PEG-diortho ester-diacyl glycerol conjugates. *Methods Enzymol.* **387:** 147–152.

Harvie P., Wong F.M.P., and Bally M.B. 2000. Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles. *J. Pharm. Sci.* **89:** 652–663.

Hermanson G.T. 1996. *Bioconjugate techniques.* Academic Press, San Diego, California.

Huang Z., Li W., MacKay J.A., and Szoka F.C., Jr. 2005. Thiocholesterol-based lipids for ordered assembly of bioresponsive gene carriers. *Mol. Ther.* **11:** 409–417.

Jeffs L.B., Palmer L.R., Ambegia E.G., Giesbrecht C., Ewanick S., and MacLachlan I. 2005. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm. Res.* **22:** 362–372.

Li W., Huang Z., MacKay J.A., Grube S., and Szoka F.C. 2005. Low-pH-sensitive poly(ethylene glycol) (PEG)-stabilized plasmid nanolipoparticles: Effects of PEG chain length, lipid composition and assembly conditions on gene delivery. *J. Gene Med.* **7:** 67–79.

Mahato R.I. and Kim S.W., eds. 2002. *Pharmaceutical perspectives of nucleic acid-based therapeutics.* Taylor & Francis, London, United Kingdom.

Uster P.S., Allen T.M., Daniel B.E., Mendez C.J., Newman M.S., and Zhu G.Z. 1996. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett.* **386:** 243–246.

Wheeler J.J., Palmer L., Ossanlou M., MacLachlan I., Graham R.W., Zhang Y.P., Hope M.J., Scherrer P., and Cullis P.R. 1999. Stabilized plasmid-lipid particles: Construction and characterization. *Gene Ther.* **6:** 271–281.

Zhang Y.P., Sekirov L., Saravolac E.G., Wheeler J.J., Tardi P., Clow K., Leng E., Sun R., Cullis P.R., and Scherrer P. 1999. Stabilized plasmid-lipid particles for regional gene therapy: Formulation and transfection properties. *Gene Ther.* **6:** 1438–1447.

# 第四十一章　HVJ 脂质体和 HVJ 包装载体

Yasufumi Kaneda
Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita City, Osaka 565-0871, Japan
王均　译



## 摘要

本章描述基于灭活 HVJ（hemagglutinating virus of Japan，日本血凝病毒，又称 Sendai virus，即仙台病毒）融合介导载体的构建技术。HVJ 脂质体由含 DNA 的融合脂质体和灭活的 HVJ 组成；HVJ 包装载体则是一种更为简单的载体，它将 DNA 直接包装到灭活 HVJ 中而形成，不需要脂质体的参与。上述两种载体都具备许多优点。首先是可以用上述载体将蛋白质、多肽、寡聚核苷酸（其中包括反义寡核苷酸、诱捕性寡核苷酸和核酶）、小干扰 RNA（siRNA）和质粒 DNA 导入体外培养的细胞中或者体内的组织器官中；其次，融合介导传输载体系统可以避免起治疗效果的分子在到达细胞质之前发生降解；而且在体内重复注射载体不但不会抑制，反而能增强所输送分子的治疗效果。上述载体已经在动物模型内进行了多种基因治疗的实验，用于解决如肝硬化、听觉损伤、脑萎缩、外周动脉疾病和癌症等难题。

然而，HVJ 载体也存在着一些问题。首先，和许多其他载体传输系统一样，基因表达有时偏低。我们发现这主要是核中的一个转基因的表观修饰所引起的（Yamanl et al. 2000）。在组蛋白去乙酰基酶抑制剂的作用下，与不含抑制剂的条件相比，在癌变部位转基因的表达增加了约 20 倍（Yamamoto et al. 2003）；其次，因为 HVJ 可以与绝大部分细胞融合，因此不具备靶向的能力。静脉注射的载体会被网状内皮细胞摄取，并在肝脏、脾脏和肺中蓄积（Tsuboniwa et al. 2001）。我们将针对肾小球 Thy-1 抗原的单克隆抗体键合在脂质体上，并将它与灭活 HVJ 融合形成 HVJ 免疫脂质体。系统注射这种 HVJ 免疫脂质体后，用 FITC 标记的寡核苷酸示踪表明，寡核苷酸可以被输送到大鼠的双肾肾小球中，效率达到约 90%（Tomita et al. 2002）。最后一个缺点是在血清中 HVJ 容易降解，这可能与补体的裂解有关，然而，通过结合 HVJ 包装载体和阳离子化

的明胶，可以实现载体在小鼠血清中的稳定存在（Mima et al. 2005）。

## 引言

基因载体研究中一个很有前途的方向是将病毒载体和非病毒载体结合起来，用其中一个载体的优势来弥补另一个载体的缺陷。用这个方法可能发展出高效、低毒的载体。我们将脂质体和经紫外照射灭活的 HVJ 融合构建了具有病毒功能的脂质体（HVJ 脂质体）（Nakanishi et al. 1985；Kaneda et al. 1989a，b；Kato et al. 1991）。HVJ 属于小鼠的副流感病毒家族，含有两种截然不同的膜融合包装蛋白（Okada 1993），其结构见图 1。

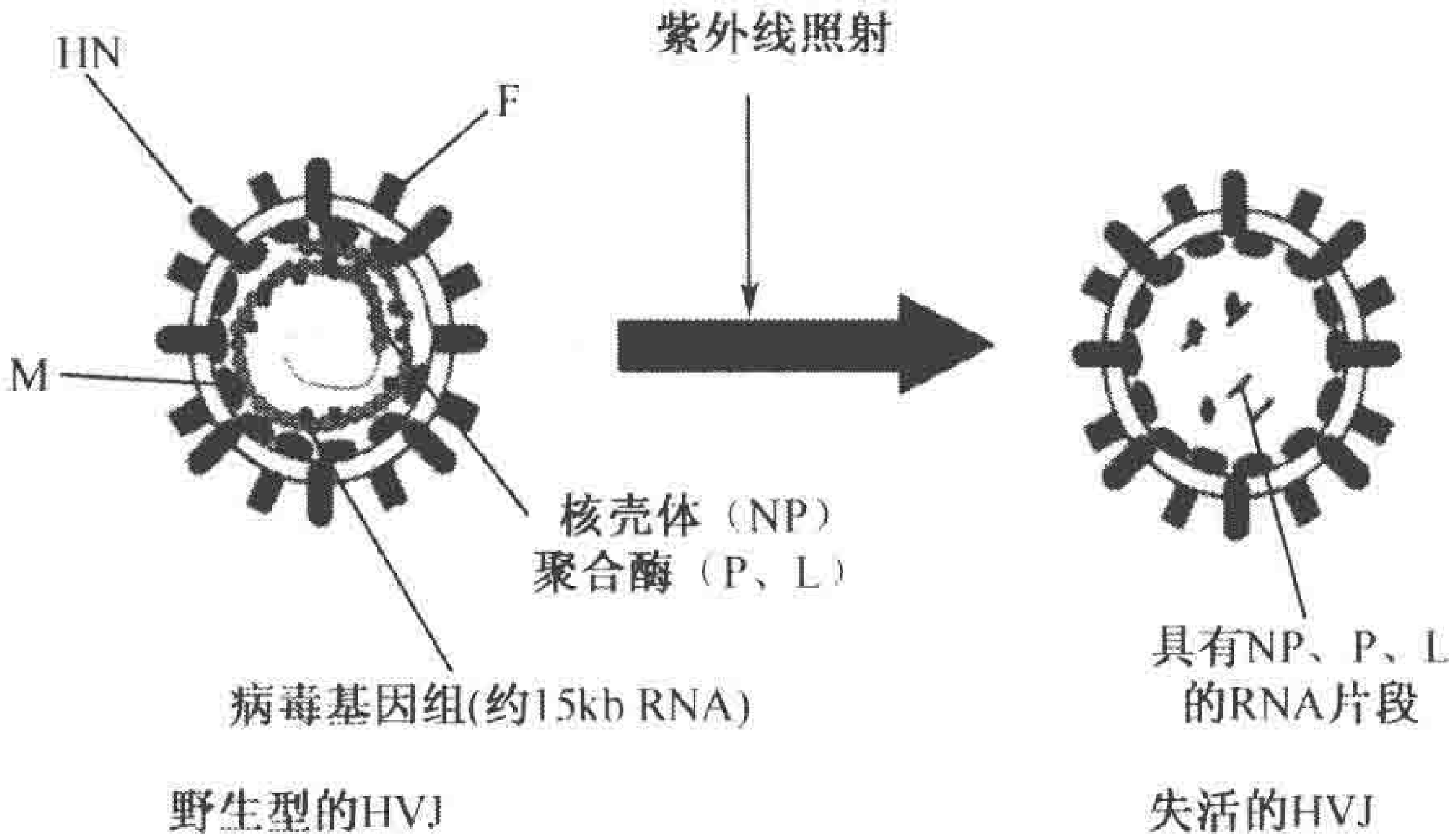



图 1. HVJ 的结构。野生型 HVJ 由融合蛋白 HN 和 F、膜锚定蛋白 M、核衣壳蛋白 NP 以及聚合酶 P 和 L，以及约 15kb 的病毒 RNA 染色体组构成。一旦野生型 HVJ 感染细胞，被感染的细胞将产生病毒蛋白质和具有感染力的病毒颗粒。经紫外照射后，病毒 RNA 被降解成小的片段。灭活的 HVJ 失去了产生病毒蛋白质和诱导染色体组复制的能力，但仍然保留了野生型 HVJ 的强融合活力。

HN（hemagglutinating，红细胞凝聚）蛋白与细胞表面的唾液酸受体结合，利用其唾液酸苷酶活性将受体降解。然后，F（融合蛋白）与脂类分子（如胆固醇）相互作用诱导细胞融合（Asano and Asano 1988）。HVJ 脂质体（直径 400～500nm）表面也含有这两种蛋白质，在与细胞表面融合后，它将 DNA 直接导入细胞质中而不使 DNA 发生降解。HVJ 脂质体可以包装尺寸小于 100kb 的 DNA，也可以包装 RNA、寡聚脱氧核苷酸和蛋白质分子，并将它们输送到细胞中（Dzau et al. 1996；Kaneda et al. 1999）。我们用 FRET（荧光共振能量转移）的方法证明了用 HVJ 脂质体作为载体，可以抑制寡聚脱氧核苷酸在输送到细胞质过程中的降解，但是简单的阳离子脂质体则不具备这种抑制作用（Nakamura et al. 2001）。HVJ 脂质体的一个显著优势在于它可以反复注射而不抑制转基因的效率。在对大鼠的肝脏进行反复注射 HVJ 脂质体后，发现大鼠体内产生的抗 HVJ 抗体并不足以中和 HVJ 脂质体（Hiarano et al. 1998）。体内的重复转染在癌症（Yamamoto et al. 2003）、肝脏（Hirano et al. 1998）和骨骼肌中（Ueki et al. 1999）也是成功的。

为了增强 HVJ 脂质体基因传输的效率，我们研究了脂质体脂类组成的影响，得到的结论是实现最有效的基因表达的脂质体中卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、磷脂酰丝

氨酸和胆固醇的摩尔比是 13.3：13.3：13.3：10：50（Saeki et al. 1997）。脂质体中脂类的组成与 HIV 外壳和红细胞的细胞膜极为相似（Chander and Schreier 1992）。我们将这种脂质体命名为 HVJ-AVE（artificial viral envelope，人工病毒包被）脂质体。使用 HVJ-AVE 脂质体，在心脏、肝脏和肌肉中的基因表达比大量非病毒基因传输方法（如传统的 HVJ 脂质体、阳离子脂类介导的转染以及裸 DNA 的直接注射的方法）要高 5～10 倍（Kaneda et al. 1999）。

另一个改进办法是用阳离子脂类构建阳离子型的 HVJ 脂质体。在所有阳离子脂质材料中，带正电荷的 DC-cholesterol {3β-[*N*-(*N'*，*N*-二甲基氨基乙基）氨基甲酰]胆固醇}（Goyal and Huang 1995），已经被证明对于基因输送最为有效。在萤火虫萤光素酶的表达测试中，HVJ-阳离子 DC 脂质体比传统的 HVJ 阴离子脂质体效率高 100 多倍（Saeki et al. 1997）。尽管 HVJ 阳离子脂质体并不适合将基因传输到肝脏、肾脏、心脏和肌肉组织，但是与阴离子型的 HVJ-AVE 脂质体相比，在动物模型中它将基因传送到肿瘤部位和转移型癌症的效率要高得多（Mabuchi et al. 1997；Miyata et al. 2001；Otomo et al. 2001）。

一个更直接实用的方法是将有融合特性的病毒体转化到一个非病毒基因输送颗粒中。基于这一概念，我们进一步发展了 HVJ 包装载体（Kaneda et al. 2002）——在没有脂质体的条件下通过表面活性剂处理，将外源的 DNA 导入灭活 HVJ 中再离心，所得到的 HVJ 包装载体可以迅速有效地将质粒 DNA 导入体外培养的细胞和体内的器官组织中。而且，蛋白质、合成的寡聚脱氧核苷酸和小分子药物都可以利用 HVJ 包装载体有效地导入到细胞中。同时，HVJ 包装载体也被证明是传输 siRNA 的有效载体（Ito et al. 2003；Asada et al. 2004；Kuribara et al. 2004；Ohnuma et al. 2004），成为离体和体内基因治疗实验的一种颇有前途的工具。例如，用 HVJ 包装载体将肝细胞生长因子基因输送到大鼠的脑脊液中可以减少（在某些情况下甚至可以阻止）听力损伤和脑萎缩（Oshima et al. 2004；Shimamura et al. 2004）；用 HVJ 包装载体将 *lacZ* 基因输送到小鼠子宫，主要在子宫内膜上腺体表皮中产生基因表达（Nakamura et al. 2003）；用 HVJ 包装载体成功地输送 Rad51 的 siRNA 到肿瘤部位，可使得癌变细胞对顺铂的敏感性得到显著提高（Ito et al. 2005）。我们已经建立了制备商业化生产临床级 HVJ 包装载体的试验性方案，以将其最终用于人类疾病的基因治疗。

## 方案

# 用于基因传输的 HVJ 脂质体和 HVJ 包装载体的制备

我们在这里描述 HVJ 脂质体和 HVJ 包装载体的制备以及用它们传输质粒 DNA 到不同细胞和组织的方法。

### 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

## 试剂

BSS（缓冲盐溶液）

137mmol/L NaCl

5.4mmol/L KCl

10mmol/L Tris-HCl（pH 7.6）

将 8g NaCl、0.4g KCl 和 1.21g Tris 碱溶解在蒸馏水中，用 1mol/L 盐酸调节 pH 至 7.6，再用蒸馏水定容到 1L。高压灭菌，4℃储藏。

牛脑磷脂酰丝氨酸钠胆盐（PS），色谱纯（Avanti Polar Lipids Inc.）

氯仿（Sigma-Aldrich）<!>

胆固醇（Sigma-Aldrich）

DC-胆固醇（Avanti Polar Lipids Inc.）

DMSO（二甲亚砜）（Sigma-Aldrich）<!>

DOPE（1，2-二油酰磷脂酰乙醇胺）（Sigma-Aldrich）

从 HVJ（Z 系，VR-105，ATCC）而来的 HVJ 种子

将 HVJ 最好的种子保存在 10%的 DMSO 中，100μl 分装。

氮气<!>

磷酸盐缓冲液（PBS）

从鸡蛋黄中提取的卵磷脂（PC）（Sigma-Aldrich）

质粒 DNA

柱色谱纯化质粒 DNA，溶于 TE（4mg/ml）缓冲液，BSS 或水中，保存在－20℃。DNA 的终浓度应该大于 1mg/ml。

多聚蛋白胨溶液

1%多聚蛋白胨（酪蛋白的胰腺消化物；Wako，Osaka，Japan）

0.2% NaCl（pH 7.2）

将 5g 多聚蛋白胨和 1g NaCl 溶解在蒸馏水中，用 1mol/L NaOH 溶液调整 pH 至 7.2，再用蒸馏水定容到 500ml，高压灭菌后 4℃储藏。

硫酸鱼精蛋白（10mg/ml，溶于 PBS 中）

鞘磷脂（Sigma-Aldrich）

蔗糖梯度溶液

将 150g 和 300g 蔗糖分别溶于 BSS 中，再用 BSS 定容到 500ml，高压灭菌后 4℃储藏，获得 30%和 60%（*m/V*）的蔗糖溶液。

Tris-EDTA（TE）

10mmol/L Tris-Cl（pH 8.0）

1mmol/L EDTA

Triton X-100（2%，溶于 TE 溶液中）

## 仪器

醋酸纤维素滤膜（0.45μm 和 0.20μm）（Nalgene）

离心机（J2-HS），含 JA-20 的转子和 35ml 离心管（Beckman Instruments）

低速离心机（05PR-22，Hitachi，Tokyo，Japan）

分离柱（不含内霉素，用于制备质粒 DNA）（QIAGEN）

塑料离心管（50ml）（Becton-Dickinson）

玻璃管（24mm 口径，12cm 长）（Fujiston 24/40，Iwaki Class Co. Ltd，Tokyo，Japan）

这些玻璃管可以定做，也可使用类似抗氯仿腐蚀的灭菌管。新管在使用前在饱和的 KOH-乙醇溶液中浸泡 24h，用蒸馏水清洗后，180℃下加热 2h。

分光光度仪（DU-68，Beckman Instruments）

旋转蒸发仪（型号 SR-650，Tokyo Rikakikai Inc.，Tokyo，Japan）

超速离心机，带 RPS-40T 转子（55P-72，Hitachi）

超速离心机管（12ml）（Hitachi）

紫外交联仪（Spectrolinker XL-1000，Spectronics Co.）

带压力表的真空泵（Asp-13 型，Iwaki Glass Co. Ltd.，Tokyo，Japan）

## 方法

### 在即将孵出小鸡的鸡蛋中制备 HVJ

1. 将 HVJ 病毒种子迅速解冻，然后用多聚蛋白胨溶液按 1∶1000 的比例稀释。

   将稀释后的种子保存在 4℃，直到开始下一步实验。

2. 室温条件下，在黑室中用光照观察鸡胚，在绒毛尿囊膜上方约 0.5mm 处标记上一个注射的点，用碘酊消毒后在标记处穿刺。
3. 用带 26 号针头的 1ml 无菌注射器将 0.1ml 稀释的病毒种子注射入每个鸡蛋中。将针头垂直插入以便刺破绒毛尿囊膜。
4. 接种病毒种子之后，将鸡蛋上由于注射所形成的洞用融化的石蜡覆盖，在 36.5℃和充足的湿度条件下培养鸡蛋 4d。在收获病毒之前要将鸡蛋在 4℃下预冷至少 6h。
5. 收获病毒：剥去一部分鸡蛋壳，用带 18 号针头的 10ml 注射器将绒毛尿囊膜胚液转移到灭菌瓶中，4℃保存，避免结冰。

   这一步可以在室温条件下完成，病毒在液体中可以稳定存在 3 个月。

### 绒毛尿囊膜胚液 HVJ 的纯化

6. 将 200ml 绒毛尿囊膜胚液分装到 4 个 50ml 锥形离心管中，用低速离心机在 4℃，3000r/min（1000*g*）离心 10min。
7. 将上清分装在 6 个离心管（Beckman JS-20）中，在 4℃，15 000r/min（27 000*g*）离心 30min。
8. 在每个离心管的沉淀中加入 5ml BSS，在 4℃条件下过夜。
9. 轻轻地将沉淀重悬浮，悬液分装在两个离心管中，按步骤 6 的设置离心。
10. 再在每管中加入 5ml BSS，在 4℃条件下培养 8h 以上。
11. 轻轻重悬沉淀，4℃，3000r/min（1000*g*）离心 15min。将上清转移到一个无菌管

中，4℃保存。

12. 将上清稀释 10 倍后，用分光光度计在 540nm 处测量吸光度来确定病毒的浓度。HVJ 可以利用紫外交联仪在 99mjoules/$cm^2$ 的强度照射下灭活。

    在 540nm 处的一个光学密度单位与 15 000 个红血球凝聚单位相当，而红血球凝聚单位可以反映融合的活性。按照上述方法制备的上清通常显示 20 000～30 000HAU/mL。无菌制备的病毒溶液可以保持融合活性 3 个星期，用紫外照射灭活的 HVJ 可以保存在 10%的 DMSO 中，在－80℃或－170℃（液氮中）活性可以保持超过 6 个月。

## 脂类复合物的制备

13. 将 DOPE（12.2mg）、鞘磷脂（11.5mg）、胆固醇（23.8mg）溶于 3870μl 氯仿中，制备脂类溶液；将 100mg PC 溶解在 1ml 氯仿中，取 130μl 与 3870μl 脂类溶液混合。

    制得的 4000μl 混合物称为脂质体的基本混合物，更高级的混合物被用来制备阴离子或阳离子脂质体（如下所示），或者氮气下－20℃保存。

14. 阴离子脂质体混合物的制备：加入 10mg 的 PS 到上述基本混合物中去；阳离子脂质体的制备：加入 6mg 的 DC-胆固醇到上述基本混合物中去。

15. 将得到的脂类溶液分装到 8 个玻璃管中，每管含 0.5ml，其中包括 8.8mg 脂类物质，把这些玻璃管置于冰上或者氮气中－20℃保存，直到挥发溶剂之前。

    脂类溶液应该尽快将其中的溶剂挥发。

16. 将玻璃管连接到旋转蒸发仪上，将玻璃管的端部浸没在 40℃的水浴中，在真空条件下蒸发有机溶剂 5～10min。

    适合于做脂质体的脂类物质是那些紧贴在玻璃管内壁上并形成薄层的，沉积在管底部的脂类物质则并不合适。将得到的脂类物质在氮气中－20℃保存，有效期为 1 个月。

## HVJ 载体的制备和输送

17. 用于融合介导基因转染的 HVJ 载体的制备

    **含 DNA 的 HVJ 脂质体的制备（图 2）**

    a. 将质粒 DNA（200μl 中含有 200μg 的 DNA）加入到一玻璃管的脂类混合物中（步骤 16），涡旋振荡 30s，接着在 37℃中培养 30s。如此循环 8 次。

       用这种方法，质粒 DNA（最大 20kb）能够以 10%～30%的效率被阴离子脂质体包裹，或者以 50%～60%的效率被阳离子脂质体包裹。

    b. 将脂质体悬液通过 0.45μm 孔径的醋酸纤维素滤膜，再通过孔径为 0.2μm 的膜，获得粒径均一的脂质体。

       使用带有聚碳酸酯滤膜的挤出机制备脂质体得到的粒径更均一。

    c. 加入 15 000HVU 的紫外灭活 HVJ 病毒到脂质体悬液中，将玻璃管置于冰上 5～10min，然后在恒温 37℃的振荡水浴锅（速率 120/min）中培养 1h。

    d. 在离心管中先加入 1ml 60%的蔗糖溶液，再加入 7ml 30%的蔗糖溶液，在其上覆盖 HVJ-脂质体混合物，最后用 BSS 将离心管装满。

    e. 用蔗糖梯度离心的方法分离 HVJ-脂质体复合物和 HVJ，在 4℃，62 000$g$ 的条

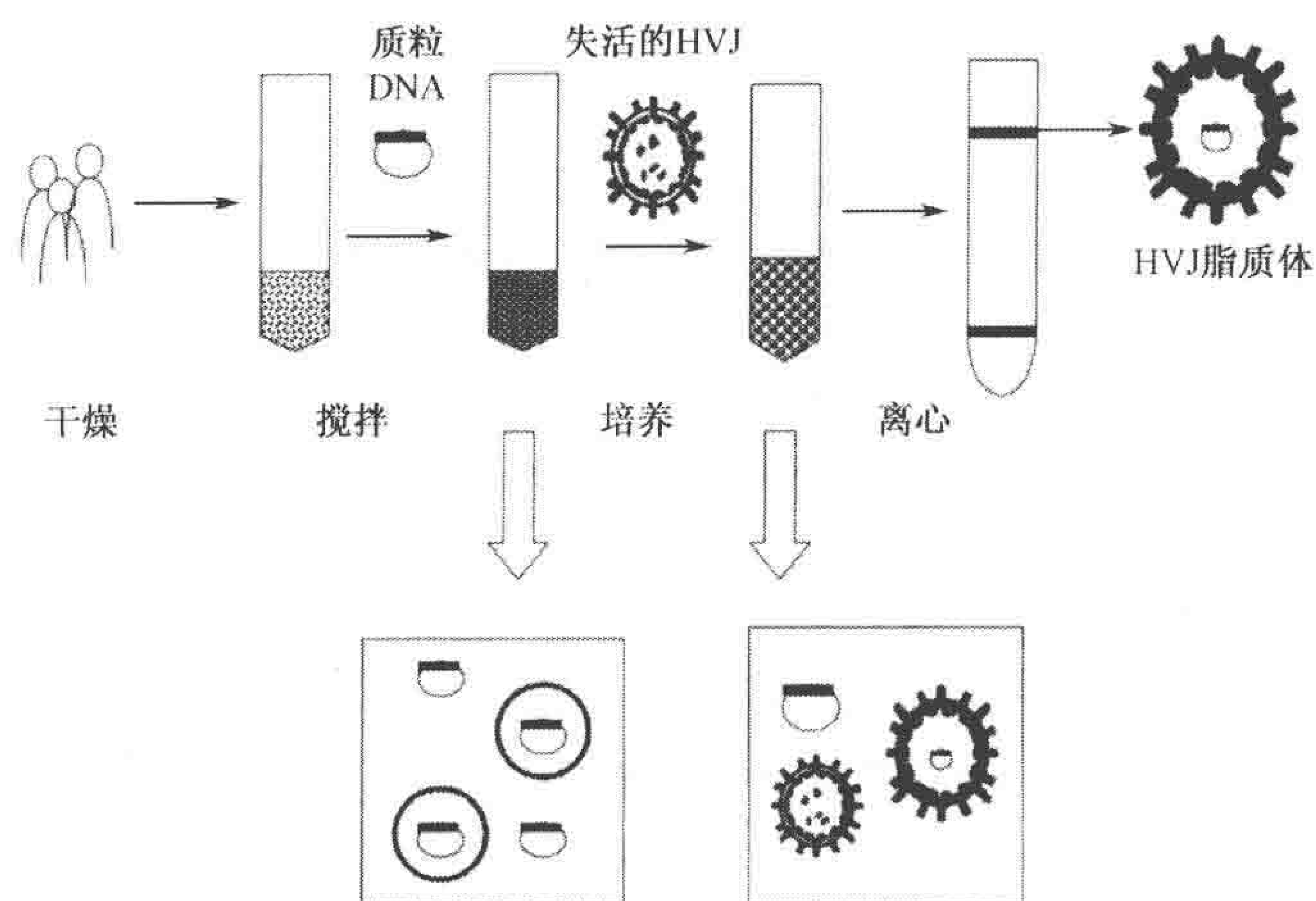



图 2. HVJ 脂质体的制备。首先在玻璃管中制备脂质体混合物。将质粒 DNA 加入到混合物中，用涡旋振荡器剧烈振荡制备载有 DNA 的脂质体，然后将灭活 HVJ 加入到脂质体溶液中，在 37℃条件下培养诱导 HVJ 和脂质体的融合。用蔗糖梯度离心的方法分离 HVJ 脂质体和游离的 HVJ。从 30%蔗糖上层收集 HVJ 脂质体，游离的 HVJ 沉淀在 30%～60%蔗糖层。

件下离心 90min。

f. 取出离心管，小心收集 HVJ-脂质体复合物，它只位于 30%的蔗糖梯度以上层。
   HVJ 集中在 30%和 60%的蔗糖梯度层之间，HVJ-脂质体悬液的终体积约为 1ml。HVJ 脂质体可以保存在 10%的 DMSO 中，在－80℃或－170℃（液氮中）的储藏条件下有效期大于 8 个月，但是应当避免反复冻融。

**HVJ 包装载体的制备（图 3）**

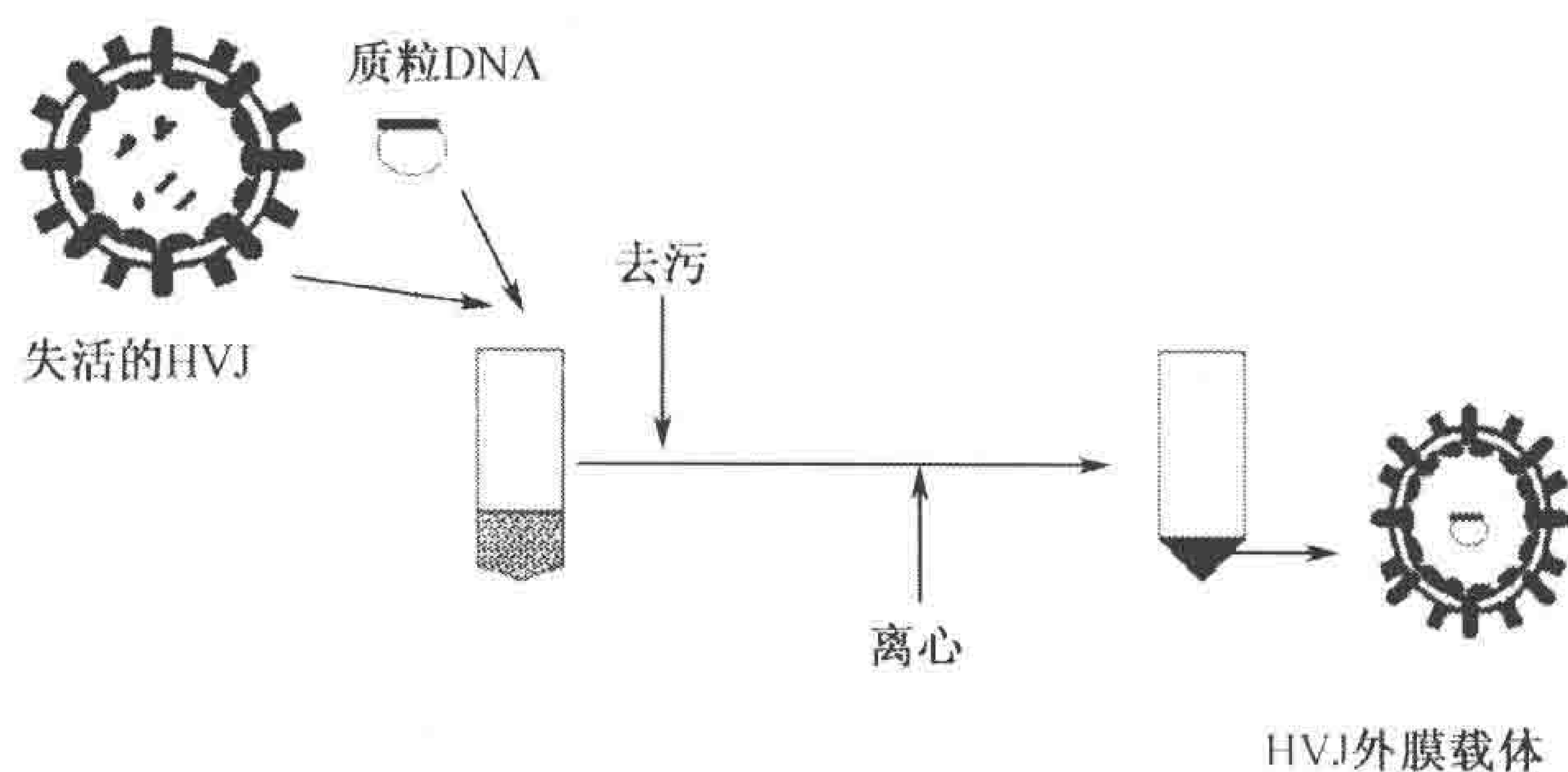



图 3. HVJ 包装载体的制备。混合灭活 HVJ 和质粒 DNA，加入表面活性剂 Triton X-100。通过离心混合物将 DNA 包裹在灭活 HVJ 颗粒中，形成 HVJ 包装载体，未能包裹的 DNA 可以通过离心的方式除去。

a. 用 40μl 的 TE 缓冲液重悬紫外照射灭活的 HVJ（$3\times10^{10}$个颗粒，10 000HAU）。
   如果灭活 HVJ 悬液被过度稀释，先用 10 000*g* 离心 5min 沉淀 HVJ 颗粒，然后再用合适体积的 TE 缓冲液重悬浮来调整浓度。

b. 将病毒悬液与质粒 DNA（50μl 中含有 200μg）和 5μl 的 Triton X-100 混合，4℃下 10 000*g* 离心 5min。

c. 去除上清，将载体重悬浮于 300μl 的 PBS 中。

载体在 4℃条件下可以保存一周。

18. 选择适合于不同研究的系统，将遗传物质输送到细胞或组织中。

**利用 HVJ-阳离子脂质体将基因输送到体外培养的细胞中**

a. 将 100μl 的 HVJ-阳离子脂质体悬液加入到培养在 6 孔板的细胞中（其中每孔含 $2\times10^6$ 个细胞，培养基含有血清）。

体外的基因输送应使用 HVJ-阳离子脂质体，原因是体外实验中 HVJ-阳离子脂质体的效率比 HVJ-阴离子脂质体要高出约 100 倍（Saeki et al. 1997）。

b. 将细胞与脂质体在 37℃条件下培养 2h。

c. 去除旧的培养基，添加新鲜培养基，继续培养。

**利用 HVJ-阴离子脂质体将基因输送到动物的组织中**

阴离子脂质体可用于啮齿动物、兔子、狗、羊和猴子的肝脏、骨骼肌、心脏、肺、动脉、脑、脾、眼睛和关节部位的基因输送。

a. 基因输送到大鼠肝脏：用 5ml 注射器配上蝴蝶型的针头，将 2～3ml 的 HVJ-阴离子脂质体注射入门静脉中（Kaneda et al. 1989a，b），或者用 5ml 注射器配上 27 号针头直接将脂质体由内脏周围的膜下方注射入肝脏中（Kato et al. 1991）。

b. 基因输送到大鼠肾脏：将 1ml 的 HVJ-阴离子脂质体注射到肾动脉中（Tomita et al. 1992；Isaka et al. 1993）。

c. 基因输送到大鼠颈动脉：用套管将动脉血管内腔的一部分充满 0.5ml 的阴离子 HVJ-脂质体复合物，在室温条件下保持 20min（Morishita et al. 1993）。

d. 基因输送到肿瘤组织或者转移性肿瘤：将阳离子 HVJ 脂质体（0.1～0.5ml）直接注射到肿瘤组织或者肿瘤渗透部位（Mabuchi et al. 1997）。

**用 HVJ 包装载体将基因输送到培养的贴壁细胞**

a. 将 30μl 载体悬液与 10μl 的鱼精蛋白溶液混合。

b. 混合物与 1ml 含胎牛血清的培养基一起加入到培养有细胞的 6 孔板中。

c. 将细胞与载体培养 10min～24h。

d. 换液后继续培养。

**利用 HVJ 包装载体将基因输送到培养的悬浮细胞**

a. 将 30μl 载体悬液与 10μl 的鱼精蛋白溶液混合。

b. 载体与细胞混合在微型离心机中 35℃条件下，以 2000～12 000r/min 的转速离心 10～30min。

c. 除去上清，将细胞用 1～2ml 含血清的新鲜培养基重悬浮，再转移至 6 孔板中。

**利用 HVJ 包装载体将基因输送到动物组织中**

体内转染：直接将 HVJ 包装载体（$3\times10^9$～$9\times10^9$ 个颗粒）注射入动物组织中，而不加入硫酸鱼精蛋白（Nakamura et al. 2003；Oshima et al. 2004；Shimamura et al. 2004；Ito et al. 2005）。

这种方法与前面所描述的利用 HVJ 脂质体的方法类似。

## 对基因传输的成功与否进行评价

19. 用合适的分析方法检测基因的表达。

# 参考文献


Asada M., Ohmi K., Delia D., Enosawa S., Suzuki S., Yuo A., Suzuki H., and Mizutani S. 2004. Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 8236–8243.

Asano K. and Asano A. 1988. Binding of cholesterol and inhibitory peptide derivatives with the fusogenic hydrophobic sequence of F-glycoprotein of HVJ (Sendai virus): Possible implication in the fusion reaction. *Biochemistry* **27:** 1321–1329.

Chander R. and Schreier H. 1992. Artificial viral envelopes containing recombinant human immunodeficiency virus (HIV) gp160. *Life Sci.* **50:** 481–489.

Dzau V.J., Mann M., Morishita R., and Kaneda Y. 1996. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11421–11425.

Goyal K. and Huang L. 1995. Gene therapy using DC-Chol liposomes. *J. Liposome Res.* **5:** 49–59.

Hirano T., Fujimoto J., Ueki T., Yamamoto H., Iwasaki T., Morishita R., Sawa Y., Kaneda Y., Takahashi H., and Okada E. 1998. Persistent gene expression in rat liver in vivo by repetitive transfections using HVJ-liposome. *Gene Ther.* **5:** 459–464.

Isaka Y., Fujiwara Y., Ueda N., Kaneda Y., Kamada T., and Imai E. 1993. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection with TGF-β or PDGF gene into rat kidney. *J. Clin. Invest.* **92:** 2597–2601.

Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K., and Kaneda Y. 2005. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin. *J. Gene Med.* **7:** 1044–1052.

Ito Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., and Fujino M. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature* **422:** 173–176.

Kaneda Y., Iwai K., and Uchida T. 1989a. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* **243:** 375–378.

———. 1989b. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* **264:** 12126–12129.

Kaneda Y., Saeki Y., and Morishita R. 1999. Gene therapy using HVJ-liposomes: The best of both worlds? *Mol. Med. Today* **5:** 298–303.

Kaneda Y., Nakajima T., Nishikawa T., Yamamoto S., Ikegami H., Suzuki N., Nakamura H., Morishita R., and Kotani H. 2002. HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol. Ther.* **6:** 219–226.

Kato K., Nakanishi M., Kaneda Y., Uchida T., and Okada Y. 1991. Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* **266:** 3361–3364.

Kuribara R., Honda H., Matsui H., Shinjyo T., Inukai T., Sugita K., Nakazawa S., Hirai H., Ozawa K., and Inaba T. 2004. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 6172–6183.

Mabuchi E., Shimizu K., Miyao Y., Kaneda Y., Kishima H., Tamura M., Ikenaka K., and Hayakawa T. 1997. Gene delivery by HVJ-liposome in the experimental gene therapy of murine glioma. *Gene Ther.* **4:** 768–772.

Mima H., Tomoshige R., Kanamori T., Tabata Y., Yamamoto S., Ito S., Tamai K., and Kaneda Y. 2005. Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector. *J. Gene Med.* **7:** 888–897.

Miyata T., Yamamoto S., Sakamoto K., Morishita R., and Kaneda Y. 2001. Novel immunotherapy for peritoneal dissemination of murine colon cancer with macrophage inflammatory protein-1β mediated by a tumor-specific vector, HVJ-cationic liposomes. *Cancer Gene Ther.* **8:** 852–860.

Morishita R., Gibbons G.H., Kaneda Y., Ogihara T., and Dzau V.J. 1993. Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin angiotensin system. *J. Clin. Invest.* **91:** 2580–2585.

Nakamura H., Kimura T., Ikegami H., Ogita K., Kohyama S., Shimoya K., Tsujie T., Koyama M., Kaneda Y., and Murata Y. 2003. Highly efficient and minimally invasive in vivo gene transfer to the mouse uterus by hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector. *Mol. Hum. Reprod.* **9:** 603–609.

Nakamura N., Hart D.A., Frank C.B., Marchuk L.L., Shrive N.G., Ota N., Taira T., Yoshikawa H., and Kaneda Y. 2001. Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated with effective antisense gene inhibition. *J. Biochem.* **129:** 755–759.

Nakanishi M., Uchida T., Sugawa H., Ishiura M., and Okada Y. 1985. Efficient introduction of liposomes into cells using HVJ (Sendai virus). *Exp. Cell Res.* **159:** 399–409.

Ohnuma K., Yamochi T., Uchiyama M., Nishibashi K., Yoshikawa N., Shimizu N., Iwata S., Tanaka S., Dang N.H., and Morimoto C. 2004. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 14186-14191.

Okada Y. 1993. Sendai-virus induced cell fusion. *Methods Enzymol.* **221:** 18–41.

Oshima K., Shimamura M., Mizuno S., Tamai K., Doi K., Morishita R., Nakamura T., Kubo T., and Kaneda Y. 2004. Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. *FASEB J.* **18:** 212–214.

Otomo T., Yamamoto S., Morishita R., and Kaneda Y. 2001. EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo: Applications to gene therapy for cancer. *J. Gene Med.* **3:** 345–352.

Saeki Y., Matsumoto N., Nakano Y., Mori M., Awai K., and Kaneda Y. 1997. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **8:** 2133–2141.

Shimamura M., Sato N., Oshima K., Aoki M., Kurinami H., Waguri S., Uchiyama Y., Ogihara T., Kaneda Y., and Morishita R. 2004. A novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Over-expression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* **109:** 424–431.

Tomita N., Higaki J., Morishita R., Kato K., Kaneda Y., and Ogihara T. 1992. Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186:** 129–134.

Tomita N., Morishita R., Yamamoto K., Higaki J., Dzau V.J., Ogihara T., and Kaneda Y. 2002. Targeted gene therapy for rat glomerulonephritis using HVJ-immunoliposomes. *J. Gene Med.* **4:** 527–535.

Tsuboniwa N., Morishita R., Hirano T., Fujimoto J., Furukawa S., Kikumori M., Okuyama A., and Kaneda Y. 2001. Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* **12:** 469–487.

Ueki T., Kaneda Y., Tsutsui H., Nakanishi K., Sawa Y., Morishita R., Matsumoto K., Nakamura T., Takahashi H., Okamoto E., and Fujimoto J. 1999. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat. Med.* **5:** 226–230.

Yamamoto S., Yamano T., Tanaka M., Hoon D.S.B., Takao S., Morishita R., Aikou T., and Kaneda Y. 2003. A novel combination of suicide gene therapy and histone deacetylase inhibitor for treatment of malignant melanoma. *Cancer Gene Ther.* **10:** 179–186.

Yamano T., Ura K., Morishita R., Nakajima H., Monden M., and Kaneda Y. 2000. Amplification of transgene expression in vitro and in vivo using a novel inhibitor of histone deacetylase. *Mol. Ther.* **1:** 574–580.

# 第四十二章　用于基因传递的聚赖氨酸共聚物

Sung Wan Kim
Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah 84112-5820
王均　译



## 摘要

聚赖氨酸及其共聚物作为非病毒类基因载体获得了广泛的应用。尽管聚赖氨酸本身对细胞具有毒性，但通过共价键将聚乙二醇连接到聚赖氨酸链段后，细胞毒性大大降低，并且可以增加基因转染效率。我们还合成了可降解的聚赖氨酸的类似物聚氨丁基乙醇酸（polyaminobutyl glycolic acid），以及十八烷基化的聚赖氨酸（stearyl polylysine）用于传输 DNA，后者与低密度蛋白质有很强的疏水作用。这种三元“terplex”体系被证实在体内和体外都具有显著的转染水平。

## 引言

早在 20 世纪 70 年代初，Carroll 等就发现用于覆盖玻璃和塑料表面以促进细胞黏附的聚-L-赖氨酸（PLL），能够结合 DNA 分子（Carroll 1972a）。PLL 结合 DNA 的证据主要来源于对多聚核苷酸/PLL 复合物的圆二色性（CD）、X 射线晶体学、双折射、酶消化的研究（Carroll 1972b; Laemmli 1975）。PLL 的正电荷来源于它的 ε-氨基基团（具体结构参照图 1），它因此能够结合质粒 DNA 形成复合物（Pouton et al. 1998），其形状多为环形（Wagner et al. 1991; Wolfert and Seymour 1996; Wolfert et al. 1996; Tang and Szoka 1997）或球形（Dunlap et al. 1997）。随后的研究表明这些 PLL/DNA 复合物能进入细胞（Kawai and Nishizawa 1984），但转染水平非常低，并且聚赖氨酸本

身具有细胞毒性。此外，浓度、离子强度和溶剂类型等因素的变化有时造成 PLL/质粒 DNA 复合物从溶液中沉淀下来（Choi et al. 1998a，b）。

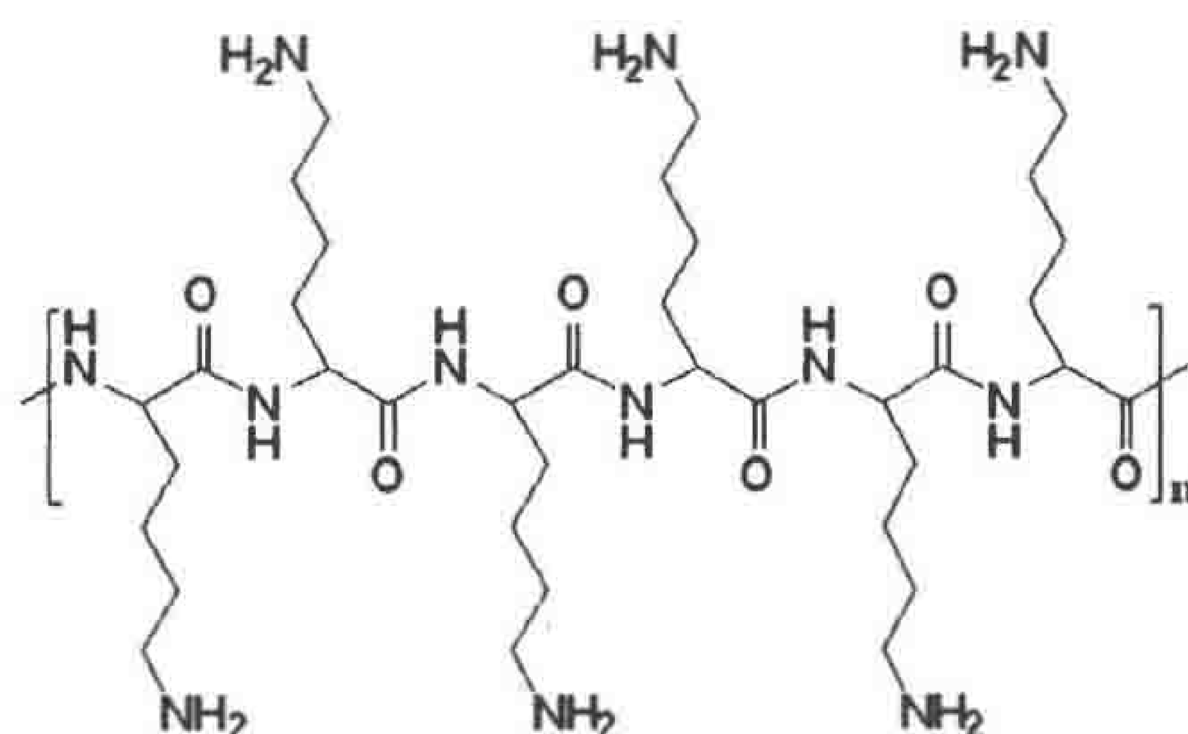



图 1．聚赖氨酸的结构示意图。

为了降低其毒性并提高转染的效率，研究人员尝试将 PLL/DNA 复合物同其他辅助成分混合，或是将辅助成分与 PLL 化学键合。例如，将 PEG 与 PLL 通过共价键相连可以降低细胞毒性，并提高复合物的溶解性能和转染能力（Choi et al. 1998b；Toncheva et al. 1998）。还有研究将靶向剂如抗体、糖类分子、功能性蛋白质分子或者其他聚合物和 PLL 结合，以提高转染效率。表 1 总结了各种基于聚赖氨酸键合物的基因传输体系，其中包括聚合物分子质量的影响、转染条件、测试的细胞系，以及使用的报告基因类型和辅助成分如何影响基因传输效率的分析等。

由于 PLL 上 ε-氨基质子化后带正电荷，它和 DNA 分子磷酸酯骨架的负电荷相互作用，从而凝结质粒 DNA 分子。尽管 PLL 本身可以结合质粒 DNA 分子，但由于 ε-氨基的 pKa（9.3～9.5）较高，无法有效缓冲晚期内含体的酸性环境而使其应用受到限制。PLL 经组氨酸残基（pKa 6.7～7.1）修饰后，具有更强的质子缓冲能力（Pack et al. 2000；Putnam et al. 2001；Bikram et al. 2003）。PLL/质粒 DNA 复合物在生理盐水环境中容易聚集。聚［α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸］(PAGA）是一个更容易降解的 PLL 类似物，它与 PLL 不同之处在于其主链通过酯键而非肽键连接。PAGA 的合成是通过亚硝酸钠和硫酸的重氮化作用，将 ε-氨基被 CBZ 保护的赖氨酸的另一个氨基转化成羟基（Lim et al. 2000 a，b），并在 150℃真空状态下熔融缩聚，最后脱去 CBZ 保护基团。PAGA/IL-12（interleukin 12）复合物已用于预防保护 NOD 鼠的胰岛炎（Koh et al. 2000）。

PLL 与 DNA 相互作用形成可溶复合物，该复合物含两个熔点：游离 DNA 的熔点较低（$T_m$），而 PLL/DNA 复合物的熔点较高（$T_{m'}$）。随着 PLL 浓度的升高，第一个熔解温度的组分降低，显示在溶液中只有很少的游离 DNA 存在；反之，如果第二个熔解温度组分升高，则表明复合物的形成增多（Olins et al. 1967；Tsuboi et al. 1996）。该结果表明 DNA 在复合物中的热稳定性增强，并且复合物的溶解度降低，并且在低盐浓度下 PLL 和 DNA 形成复合物的过程是不可逆的。后续研究证明 PLL 几乎专一性选择腺嘌呤-胸腺嘧啶（A-T）富集的序列（Shapiro et al. 1969）。对于这种选择性，有两种解释，一是赖氨酸残基优先在一个特殊位点与一个 A-T 碱基对相互作用；另一种解释是 A-T 富集区具有“组”性质，从而导致选择性。除此之外，PLL 和 DNA 的相互作用在低盐浓度下不可逆，但在高盐浓度下则是可逆的。由于 PLL 的聚阳离子本性，使

**表 1.聚赖氨酸基因输送体系**

| PLL 结合体（%结合） | PLL（M.W.） | 相对于 PLL 的转染 | 显像 | 转染辅剂 | 细胞株/体内 | 特殊靶向/其他 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PLL-葡聚糖（%结合体未检测）移植物 | 35kDa | 没有做完的 PLL 用于比较 | pDNA GFP（绿色荧光蛋白） | | 293 Sprague Dawley 大鼠 | | de Marco et al. (1998) |
| PLL-聚（二乙基-氨基-乙基-L-谷氨酰胺）封闭共聚物 33% PLL 67% p-L-谷氨酸 | 未知共聚物 26kDa PLL M.W. | 没有做完的 PLL 用于比较 | pDNA β-半乳糖 | 氯喹无血清 | 293 | | Dekie et al. (2000) |
| PLL-抗体（抗-CD4 抗体 B-F5） | 268DP（聚合程度） | 在 Jurkat 细胞中没有用刚好的 PLL 于转染，在 K562 细胞中也几乎没有 | pDNA Luc（萤光素酶）GFP | PMA（叶啉醇肉豆蔻酸乙酸酯）有助于转染 | Jurkat K562 | Jurkat 细胞株特殊抗体 B-F5；当转染的时候 95% 的 Jurkat 表达 GFP | Puls and Minchin (1999) |
| PLL-TF（转铁蛋白） | 190DP | 腺病毒比 PLL-Tf 高 2000 倍，甚至比 PLL 更好 | pDNA Luc | 腺病毒颗粒 2% 血清 | HeLa WI-38 MRC-5KB CFT1 | | Curiel et al. (1991) |
| PLL-TF（?%） PLL-Ab$_{CD3}$（33% 结合体）PLL-抗生物素蛋白链菌素 | 300DP | 在缺少氯喹 PLL-Tf，PLL-Ab 的 H9 和 Jurakt E6 细胞中 PLL 优于 PLL-Tf | pDNA Luc β-半乳糖 | 在某些体系中 2%～10% 血清氯喹 | Jurkt 克隆 Eb-1CCRF-ECM | Eb-1 细胞株是 CD3 抗体的靶点 | Buschle et al. (1995) |
| PLL-半乳糖（1% 结合体）移植物 | 236DP | 在大鼠的肝细胞、脾脏细胞 PLL-半乳糖是较高的 | pDNA Luc β-半乳糖 | PBS | HepG2，Hu-H7，Sprague-Dawley 大鼠 | 肝细胞（HepG2，Hu-H7 有无唾液酸糖蛋白受体 | Perales et al. (1997) |
| PLL-乳糖（68% 结合体） | 30～50kDa | 在肝细胞中转染比 PLL 好 | pDNA Luc | 氯喹 1% 血清 | HepG2，HeLa229 | 肝细胞（HepG2） | Malaoux et al. (1993) |
| PLL-*g*-组氨酸（45% 结合体）移植物 | 30～50kDa（190DP） | 转染比只有 PLL 好 | pDNA Luc | 时而无血清的氯喹，时而 1%～20% 的血清 | 16HBE，A549，HepG2，Rb-1，B16，HOS，MCF-7，COS，HeLa，293T7 | HepG2 和 293T7 显示最好的转染性 | Midoux and Monsigny (1999) |

续表

| PLL结合体（%结合） | PLL（M.W.） | 相对于PLL的转染 | 显像 | 转染辅剂 | 细胞株/体内 | 特殊靶向/其他 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PLL-甘露糖(46%结合体)<br>PLL-葡萄糖(46%结合体) | 30～50kDa（190DP） | PLL-甘露糖转染是最好的；所有的糖-PLL优于只有PLL | pDNA Luc CAT | 氯喹1%血清 | 人血液衍生的单核细胞 | 24h后，看到多数的Luc | Erbacher et al.(1996) |
| （PLL/pDNA复合物）-PEG（PLL-TF/pDNA）-PEG | PLL(250DP)<br>PLL(19DP)<br>PEG(1,2,3,5,12kDa) | 仅补体的活性被检测 | n. a. [a] | n. a. [a] | 绵羊血液红细胞（红细胞） | 用水制成的PLL/pDNA复合体和NHS-PEG反应 | Plank et al.(1996) |
| PLL-PEG-乳糖（6%、12%、20%、30% lac-PEG）<br>PLL-PEG(25%结合)<br>PLL-PEG-半乳糖（23%结合） | PLL(25kDa, 120DP)PEG（550M. W） | 在HepG2细胞株上PLL-PEG-lac是较好的；lipofectin是对照；PLL-PEG-lac优于lipofectin；在NIH-3T3和A7R5细胞株转染效率较低；PLL-PEG优于PLL | pDNA<br>β-半乳糖 | 10%的血清氯喹血清变化范围0～20% | HepG2<br>A7R5 NIH-3T3 | 肝细胞目标（HepG2)糖；CD，PDNA聚合体的原子显微技术 | Choi et al.（1998a, 1999） |
| $PLL_{20k}$-$PEG_{500}$(5%、10%结合)$PLL_{11.4k}$-葡聚糖$_{1k}$（5%结合）<br>$PLL_{19k}$-$pHPMA_{4.4k}$(8%结合） | PLL(9.6,22.4, 20kDa,)PEG(5, 12kDa) | 在转染上，PLL-PEG优于PLL | pDNA<br>β-半乳糖 | 用INF7-SGSC EDP肽固定的聚合体/pDNA复合体无血清 | HepG2 293 | | Toncheva et al.(1998) |
| PLL-硬脂酰(25%结合）与LDL<br>混合复合体的商业名字是Terplex | 50kDa | 比PLL有较好的转染性 | pDNA<br>β-半乳糖 | 不时地换氯喹血清和无血清 | A7R5<br>CCD-32 | | Kim et al.（1998, 2000）；Lentz and Kim (1998) |
| PLL-NLS(来自SV40巨大T抗原的25氨基酸核定位序列）通过SPDP而交联 | 110kDa | 当与PLL-TF混合后，PLL-NLS优于PLL（2倍）；使用一个缺陷的NLS突变体和多功能的NLS相比，显示较低的转染性，但比仅仅有PLL高 | pDNA<br>β-半乳糖 | TF-PLL和PLL-NLS的混合物氯喹10%FCS | HTC大鼠肝癌 | 电子显微技术作用于复合体，用ELISA分析，基于α/β小鼠importin评估NLS在PLL/pDNA结合体的趋向性 | Chan and Jans(1999)；Chan et al.(2000) |

续表

| PLL 结合体（%结合） | PLL（M.W.） | 相对于 PLL 的转染 | 显像 | 转染辅剂 | 细胞株/体内 | 特殊靶向/其他 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 通过 strepavidin-biotin 带 PLL-EGF（内皮生长因子）相结合 PEI（DP 46 600） | DP19,36,180 | PLL(19)-EGF:32%转染 PLL(36)-EGF:38%转染 没有和单独的 PLL 进行对比 | pDNA GFP（FACS 分析）荧光显微镜 PLL-EGF-Alexa 488 PDNA-Alexa 546 | 1%胰岛素-转铁蛋白-硒补充 100μmol/L 的氯喹 | 用 EGF 转导的 Swiss-3T3 NR6 成纤维细胞 | 细胞有 EGF 受体介导的内吞作用，10%以上的细胞核显示荧光 | Schaffer et al.(2000) |
| PLL-咪唑（73.5、82.5、86.5%结合） | M.W.34 300 | 86.5%结合有最好的转染性；转染性比咪唑组好 | pDNA Luc | 4h 后移除 OPTI-MEM 培养基 | HepG2 CRL1476 P388D1 | PLL 咪唑比 PLL 的毒性小；需要小于 150nm 大小的颗粒 | Putnam et al.(2001) |
| PLL-TF-HA2 HA2 是流行性 endosomal diarupting 肽 | DP:190 DP:290 | EDP 结合转染优于 PLL；然而不结合 EPD 就没有作用 | pDNA Luc β-半乳糖 | 氯喹 其中有些无血清 | K562 HeLa BNL Cl.2 | 用脂质体分析遗漏；氯喹有较高的转染性 | Wagner et al.(1992) |
| PLL-胰岛素 | 90kDa 和 120kDa | 没有与 PLL 进行比较；通过受体介导的内摄作用（胰岛素受体）转染性增强 | pDNA pSVRP-8 质粒编码的 SV40 巨大 T 抗原 | 无血清 | PLC/PRF/5 肝癌细胞 | 通过间接的荧光和 FITC 标记的二抗检测 SV40 的表达；细胞表达胰岛素键合位点 | Rosen-kranz et al.(1992) |

其在生理条件下和带负电荷的脂双层分子膜产生静电相互作用，因而还被用作典型的模型多肽（Takahashi et al. 1991）。在这些实验中，不同分子质量的 PLL 被证实可以诱导负电性的单重囊泡聚集和融合，并伴随膜通透性的增强（Gad et al. 1982；Ohki and Daux 1986），另外，也观察到 PLL 结构从卷曲到部分有序的转变（Hartsmann and Galla 1978；Walter et al. 1986）。后续研究揭示 PLL 在与二棕榈酰磷脂酸（dipalmitoylphosphatidic acid，DPPA）囊泡相互作用时呈现 β 片层结构（Takahashi et al. 1991）。尽管 PLL 被证实可以影响隔离的囊泡，不断的研究表明 PLL 可以结合 DNA 分子，并使得研究人员对 PLL 是否可以作为载体有效地将 DNA 输送到细胞并成功表达展开了研究。我们在这里讨论能将 DNA 输送到特定细胞的三元复合体系——terplex。

terplex 体系通过电荷的平衡和疏水相互作用来稳定复合物，并且在体外实验和体内心肌梗死实验证明它是一个有效的基因输送体系（Affleck et al. 2001）。该复合体组分包括十八烷基化的 PLL（stearyl-PLL）、低密度脂蛋白（LDL）和 DNA（图 2）。十八烷基基团与脂蛋白具有疏水相互作用（Kim et al. 1997）。键合到 PLL 链上的十八烷基基团的数量通过 $^{1}$H-NMR 分析，通过化学位移在 3.0ppm 处 PLL 的 ε-甲撑质子与十八烷基的质子信号积分面积比确定十八烷基的键合比例。

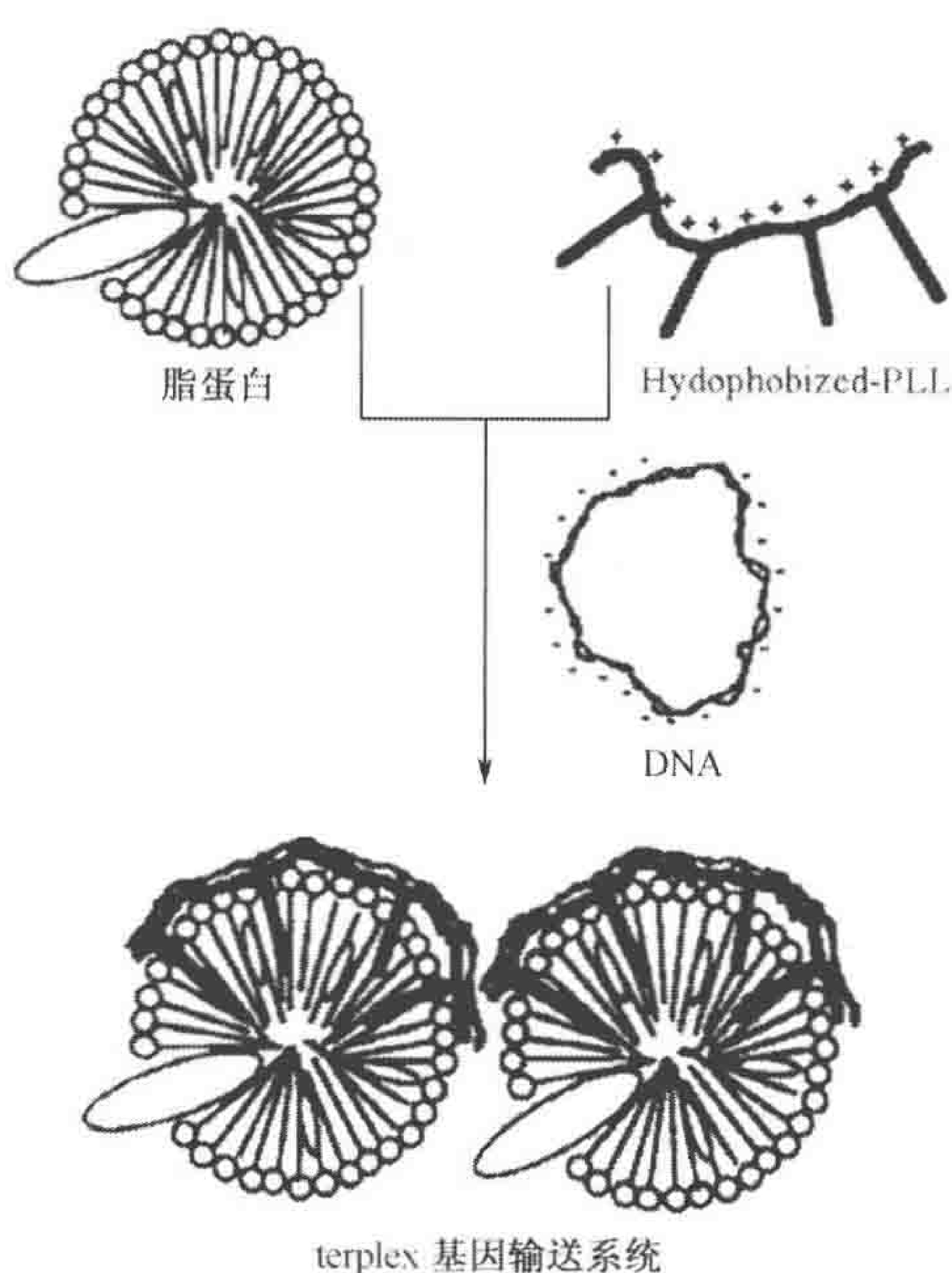



图 2．terplex 体系的形成示意图。室温下将等量的低密度脂蛋白和 H-PLL 在磷酸盐缓冲液中混合，然后加入不同量的质粒 DNA，即形成稳定的 terplex 体系（Kim et al. 1997）。

为了确定包含 DNA 的 terplex 系统在体内循环的能力，经小鼠静脉注射后，我们分析了其药代动力学参数。与裸 DNA 相比，terplex 具有增长的循环时间，在血液中滞留时间更长（Yu et al. 2001b）。用反转录-聚合酶链反应（RT-PCR）检测静脉注射包含 DNA 的 terplex 后各器官中转录基因的表达，结果显示 terplex 具有很高的转录水平（Yu et al. 2001b）。

上述研究结果显示 terplex 具有靶向传输基因到含 LDL 受体细胞的潜力。terplex 复合基因的容量、中和电荷的能力，以及降低毒副作用的性能在提高载体转染效率方面扮演着重要角色（Yu et al. 2001a）。以下方案介绍我们用 terplex 在体内和体外传输基因的研究方法。

## 方案1

# 质粒DNA的体外转染

下面的实验方法可以用来优化 terplex 的相对组成成分和对于给定细胞系的转染参数。

## 材料

### 试剂

A7R5 细胞，鼠平滑肌细胞系（American Type Cell Culture [ATCC]）

用含 10%胎牛血清的 DMEM（Dulbecco minimal essential medium）培养基在 37℃，5% $CO_2$ 的培养箱中培养。

生长培养基和胎牛血清（FBS）（HyClone Laboratories）

邻硝基苯基-β-D-半乳糖吡喃糖苷（ONPG）

磷酸盐缓冲液（PBS）

质粒 DNA，pSV-β-glactosidase 对照载体（6821bp，Promega）

terplex 复合物

通过改变 PLL 或 LDL 制备不同的复合物。室温下，在 PBS 溶液中混合十八烷基化 PLL [通过硬酯溴 *N*-烷基化 PLL（M. W. 50 000）合成] 和不同量的 LDL（更详细的内容请参考 Kim et al. 1998b）。

### 仪器

细胞培养箱，控制在 5% $CO_2$（如 Napco，Precision Scientific）

分光光度计

## 方法

1. 在转染前一天，在 24 孔板以 $2\times10^4$ 个/ml 的浓度接种 A7R5 细胞，在 37℃，5% $CO_2$ 下培养。
2. 固定质粒 DNA 的用量，在 PBS 溶液中将 DNA 与含有各种成分的 terplex 混合，并使 24 孔板每孔用于一次转染的 DNA 用量为 1μg。

   最好在转染前新鲜制备！
3. 在每孔中加入 40μl DNA 溶液（作为对照）或含 PLL、LDL 和质粒 DNA 的 terplex。
4. 在 37℃，5% $CO_2$ 的条件下培养细胞 48h，经 PBS 溶液洗涤 3 次，收集细胞用于检测 β-半乳糖苷酶活性。
5. 以 ONPG 为底物，用分光光度计在 420nm 检测转染细胞的 β-半乳糖苷酶活性。

## 方案 2

# 寡核苷酸 DNA 的体外转染

下面的实验方法描述用 terplex 输送 c-myb 反义寡核苷酸到 A7R5 或 CCD-32 细胞以及分析抗细胞增殖的方法。

## 材料

### 试剂

A7R5 细胞，鼠平滑肌细胞系（American Type Cell Culture [ATCC]）

用含 10%胎牛血清的 DMEM（Dulbecco minimal essential medium）培养基在 37℃，5% $CO_2$ 的培养箱中培养。

CCD-32 Lu，人肺纤维原细胞系（ATCC）

用含 10%胎牛血清的 EMEM（Eagle's minimal essential medium）培养基在 25$mm^2$ 的聚苯乙烯组织培养瓶（T-25 培养瓶，Falcon）培养。胰蛋白酶消化，重悬用于实验。

生长培养基和胎牛血清（FBS）（HyClone Laboratories）

MTT（3-[4，5-dimethylthiazol-2-yl]-2，5-diphenyltetrasodium bromide）（Sigma-Aldrich）

寡核苷酸

c-myb 反义寡核苷酸（18mer，5′-GTG TCG GGG TCT CCG GGC-3′）

搭配不当（mismatched）反义寡核苷酸（18mer，5′-GTC TCC GGC TCA CCC GGG-3′）

反义寡核苷酸由 Midland Certified Reagent Co. 通过亚磷胺化学法合成，并通过凝胶过滤纯化

terplex 复合物

通过改变寡核苷酸的用量制备不同的复合物。

室温下，在 PBS 溶液中混合十八烷基化 PLL [通过硬酯溴 *N*-烷基化 PLL（M. W. 50 000）合成] 和固定量的 LDL，以及变化量的寡核苷酸，来制备稳定的 terplex 复合物（更详细的内容请参考 Kim et al. 1998b）。

### 仪器

细胞培养箱，控制在 5% $CO_2$（如 Napco，Precision Scientific）

## 方法

1. 在转染前一天，以 $5\times10^4$ 个细胞/孔的密度在 96 孔板接种 A7R5 或 CCD-32 Lu 细胞，在 37℃，5% $CO_2$ 浓度下培养过夜。
2. 通过改变寡核苷酸 DNA 的量制备不同 terplex 复合物。

   最好在转染前新鲜制备！

3. 将 terplex 复合物加入到培养的细胞，在 37℃，5% $CO_2$ 下培养细胞 4h，包括含血清和不含血清两种情况。
4. 利用 MTT 法分析细胞增殖的情况（Mosmann 1983）。

## 方案 3

# 体内动物实验

下面提供一个实例，用 tetraplex 复合物输送表达血管内皮生长因子 VEGF-165 的质粒 DNA 到兔心肌。

## 材料

### 试剂

丁丙诺啡（buprenorphine）
异氟烷（isoflurane）
克他命（ketamine）（50mg/kg，肌肉注射）
磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）
质粒 DNA，pCMV-VEGF

质粒 DNA 通过双 CsCl 梯度纯化，并通过 $A_{260}/A_{280}$ 和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳确认。

兔，New Zealand White（2.5～3.5kg）（Western Oregon）
染色溶液

苏木精和曙红（hematoxylin and eosin，H&E）
trichrome

甲苯噻嗪（xylazine）（8.8mg/kg，肌肉注射）

### 仪器

血管插管（angiocatheter）
心电图扫描仪
针头（30 号）
呼吸机（rodent ventilator，Harvard Apparatus）
Standard planimetry 软件（NIH Image）
缝合线（5-0 Prolene）
超声心动图显影系统（General Electric Vivid Five or Hewlett-Packard 5500）

## 方法

1. 给新西兰白兔喂镇静剂，选取质量在 2.5～3.5kg 的白兔，肌肉注射克他命（50mg/kg）和甲苯噻嗪（8.8mg/kg）。刮掉兔子的毛并把管子插到它们的气管中。

所要准备的动物数量视研究目的确定。随机地分配这些动物到实验组或对照组（见步骤 6）。

2. 在无菌条件下对每只动物的左胸用异氟醚进行外科手术麻醉。将动物固定在呼吸机上，呼吸速度为60%和40%$FiO_2$。
3. 将左胸廓切开，缩进肺，打开心包膜。
4. 在旋动脉的第一个分支周围放置一个5-0缝合线，实施10s闭塞测试来确定心室区域。
5. 准备注射液。对于每只实验组动物，准备500μl注射液，其中含50μg LDL，50μg十八烷基化PLL和50μg pCMV-VEGF，溶于PBS（pH 7.4）中。对于每只对照组动物，准备500μl PBS注射液，含50μg LDL、50μg十八烷基化PLL。

   注射液最好新鲜配置。

6. 在心肌内插入30号针头，分4次（每次125μl）注射准备好的注射液到每只实验动物。
7. 注射后，马上按照Affleck等（2001）描述的方法诱导心肌梗死。通过目测和心电图改变判断心肌是否萎缩。
8. 经过一段时间的观察后，临时封闭气体呼出，使肺部膨胀。用插管疏散胸膜内残留的空气。
9. 缝合肋骨和肌肉层以及皮肤。
10. 待实验动物能自然呼吸时，拔出呼吸机管。手术后48h内，每12h注射一次丁丙诺啡（0.05mg/kg，肌肉注射）止痛。
11. 用克他命（20mg/kg）和甲苯噻嗪（5mg/kg）轻微麻醉兔子，在手术后的第1天和第21天记录实验动物的心电图。

    在我们的研究中，用心回波图作为处理组的盲性对照。

12. 用Hewlett-Packard 5500或General Electric Vivid Five收集图像，使用12MHz的探针。

    在我们的实验中所有的呈像均由一个有经验的超声波心动描记分析员获取，并由另一个有经验的超声波心动描记分析员进行核实，以保证不同观察者之间以及同一观察人对不同成像的之间的可靠性。胸骨右侧旁的长轴方向被用于排出量分数的二维测量。二维测量的排出量分数通过人工记录心脏舒张期结束时和心脏收缩期结束时心室面积的变化来获得。测量时每组数据重复3～5次，其平均值作为实验结果。胸骨右侧旁的短轴方向用于表征底部的环状结构，中等大小的乳状突起结构和顶点。M模式测量从每一水平的部分收缩变化中求得，这样就计算出了排出量分数。报道的报出量分数，部分收缩变化以及左心室收缩和舒张面积代表这些数值的平均值。

13. 术后第21天，通过克他命和吸入异氟烷的方法麻醉实验班动物，放血处死。
14. 用100ml常规生理盐水从主动脉根部灌注，并将心脏经中性缓冲福尔马林加压［100mmHg（$1mmHg=1.33322\times10^2 Pa$）］灌注固定。
15. 从短轴方向每5mm石蜡包封切片，苏木精和曙红染色。
16. 使用Standard planimetry software（NIH Iamge）测量正常的和梗死的左心室心肌面积。

    左心室心肌梗死百分数等于左心室心肌梗死面积（所有切片）除以左心室心肌总面积，然后乘以100。

# 参考文献


Affleck D.G., Yu L., Bull D.A., Bailey S.H., and Kim S.W. 2001. Augmentation of myocardial transfection using TerplexDNA: A novel gene delivery system. *Gene Ther.* **8:** 349–353.

Bikram M., Ahn C.H., Chae S.Y., Lee M., Yockman J.W., and Kim S.W. 2003. Novel biodegradable PEG-PLL-His multiblock copolymers for nonviral carrier mediated gene therapy. *Mol. Ther.* **1:** S221.

Buschle M., Cotton M., Kirlappos H., Mechtler K., Schaffner G., Zauner W., Birnstiel M.L., and Wagner E. 1995. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum. Gene Ther.* **6:** 753–761.

Carroll D. 1972a. Complexes of polylysine with polyuridylic acid and other polynuceotides. *Biochemistry* **11:** 426–433.

———. 1972b. Optical properties of deoxyribonucleic acid-polylysine complexes. *Biochemistry* **11:** 421–426.

Chan C.K. and Jans D.A. 1999. Enhancement of polylysine-mediated transferrinfection by nuclear localization sequences: Polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum. Gene Ther.* **10:** 1695–1702.

Chan C.K., Senden T., and Jans D.A. 2000. Supramolecular structure and nuclear targeting efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines. *Gene Ther.* **7:** 1690–1697.

Choi Y.H., Liu F., Park J., and Kim S.W. 1998a. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug. Chem.* **9:** 708–718.

Choi Y.H., Liu F., Choi J.S., Kim S.W., and Park J.S. 1999. Characterizaion of a targeted gene carrier, lactose-polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine and its complex with plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10:** 2657–2665.

Choi Y.H., Liu F., Kim J.S., Choi Y.K., Park J.S., and Kim S.W. 1998b. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J. Control. Release* **54:** 39–48.

Curiel D.T., Agarway S., Wagner E., and Cotton M. 1991. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 8850–8854.

Dekie L., Toncheva V., Dubruel P., Schacht E.H., Barrett L., and Seymour L.W. 2000. Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy. *J. Control. Release* **65:** 187–202.

de Marco G., Bogdanov A., Marecos E., Moore A., Simonova M., and Weissleder R. 1998. MR imaging of gene delivery to the central nervous system with an artificial vector (see comments). *Radiology* **208:** 65–71.

Dunlap D.D., Maggi A., Soria M.R., and Monaco L. 1997. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* **25:** 3095–3101.

Erbacher P., Bousser M.T., Raimond J., Monsigny M., Midoux P., and Roche A.C. 1996. Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum. Gene Ther.* **7:** 721–729.

Gad A.E., Silver B.L., and Eytan G.D. 1982. Polycation-induced fusion of negatively charged vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **690:** 124–132.

Hartmann W. and Galla H.J. 1978. Binding of polylysine to charged bilayer membranes: Molecular organization of a lipid peptide complex. *Biochim. Biophys. Acta* **509:** 474–490.

Kawai S. and Nishizawa M. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4:** 1172–1174.

Kim J.S., Maruyama A., Akaike T., and Kim S.W. 1998. Terplex DNA delivery system as a gene carrier. *Pharm. Res.* **15:** 116–121.

Kim J.-S., Maruyama A., Akaike T., and Kim S.W. 2000. Non-viral gene delivery strategies for enhanced cellular uptake. *Biomaterials and drug delivery toward new millenium* (ed. K.D. Park et al.), pp. 237–247. Han Rim Won Publishing, Seoul, South Korea.

Kim J.S., Maruyama A., Akaike T., and Kim S.W. 1997. In vitro gene expression on smooth muscle cells using a terplex delivery system. *J. Control. Release* **47:** 51–59.

Koh J.J., Ko K.S., Lee M., Han S., Park J.S., and Kim S.W. 2000. Degradable polymeric carrier for the delivery of IL-10 plasmid DNA to prevent autoimmune insulitis of NOD mice. *Gene Ther.* **7:** 2099–2104.

Laemmli U.K. 1975. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72:** 4288–4292.

Lentz M. 2001. "Mechanistic study of gene transfection." Ph.D. thesis. University of Utah.

Lentz M.J. and Kim S.W. 1998. Terplex system for delivery of DNA and oligonucleotides. *Self-assembling complexes for gene delivery* (ed. A.V. Kabanov et al.), pp. 149–166. Wiley, New York.

Lim Y.B., Kim C.H., Kim K., Kim S.W., and Park J.S. 2000a. Development of a safe gene delivery system using biodegradable polymer, poly[α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]. *J. Am. Chem. Soc.* **122:** 6524–6525.

Lim Y.B., Han S.O., Kong H.U., Lee Y., Park J.S., Jeong B., and Kim S.W. 2000b. Biodegradable polyester, poly[α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm. Res.* **17:** 811–816.

Midoux P. and Monsigny M. 1999. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. Bioconjug. Chem. **10:** 406–411.

Midoux P., Mendes C., Legrand A., Raimond J., Mayer R., Monsigny M., and Roche A.C. 1993. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* **21:** 871–878.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65:** 55–63.

Ohki S. and Duax J. 1986. Effects of cations and polyamines on the aggregation and fusion of phosphatidylserine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **861:** 177–186.

Olins D.E., Olins A.L., and Von Hippel P.H. 1967. Model nucleoprotein complexes: Studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA. *J. Mol. Biol.* **24:** 157–176.

Pack D.W., Putnam D., and Langer R. 2000. Design of imidazole containing endosomolytic biopolymer for gene delivery. *Biotech. Bioeng.* **67:** 217–223.

Perales J.C., Grossmann G.A., Molas M., Liu G., Ferkol T., Harpst J., Oda H., and Hannson R.W. 1997. Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **272:** 7398–7407.

Plank C., Mechtler K., Szoka F.C., and Wagner E. 1996. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **7:** 1437–1446.

Pouton C.W., Lucas P., Thomas B.J., Uduchi A.N., Milroy D.A, and Moss S.H. 1998. Polycation-DNA complexes for gene delivery: A comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J. Control. Release* **53:** 289–299.

Puls R. and Minchin R. 1999. Gene transfer and expression of a non-viral polycation-based vector in $CD4^+$ cells. *Gene Ther.* **6:** 1774–1778.

Putnam D., Gentry C.A., Pack D.W., and Langer R. 2001. Polymer based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 1200–1205.

Rosenkranz A.A., Yachmenev S.V., Jans D.A., Serebryakova N.V., Murav'ev V.I., Peters R., and Sobolev A.S. 1992. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp. Cell Res.* **199:** 323–329.

Schaffer D.V., Fidelman N.A., Dan N., and Lauffenburger D.A. 2000. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **67:** 598–606.

Shapiro J.T., Leng M., and Felsenfeld G. 1969. Deoxyribonucleic acid-polylysine complexes: Structure and nucleotide specificity. *Biochemistry* **8:** 3119–3132.

Takahashi H., Matuoka S., Kato S., Ohki K., and Hatta I. 1991. Electrostatic interaction of poly(L-lysine) with dipalmi-

toylphosphatidic acid studied by X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta* **1069:** 229–234.

Tang M.X. and Szoka F.C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* **4:** 823–832.

Toncheva V., Wolfert M., Dash P., Oupicky D., Ulbrich K., Seymour L., and Schacht E., 1998. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim. Biophys. Acta* **1380:** 354–368.

Tsuboi M., Matsuo K., and Ts'o P.O. 1996. Interaction of poly-L-lysine and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **15:** 256–267.

Wagner E., Cotton M., Foisner R., and Birnstier M.L. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: The effect of polcations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 4255–4259.

Wagner E., Plank C., Zatloukai K., Cotton M., and Birnstiel M. 1992. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 7934–7938.

Walter A., Steer C.J., and Blumenthal R. 1986. Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipids vesicles: A model for polycation-induced fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **861:** 319–330.

Wolfert M.A. and Seymour L.W. 1996. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther.* **3:** 269–273.

Wolfert M., Schacht E., Toncheva V., Ulbrich K., Nazarova O., and Seymour L. 1996. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum. Gene Ther.* **7:** 2123–2133.

Yu L., Nielson M., Han S.O., and Kim S.W. 2001a. TerplexDNA gene carrier system targeting artery wall cells. *J. Control. Release* **72:** 179–185.

Yu L., Suh H., Koh J.J., and Kim S.W. 2001b. Systemic administration of TerplexDNA system: Pharmacokinetics and gene expression. *Pharm. Res.* **18:** 1277–1283.

# 第四十三章　用于靶向基因传递的 PEI 纳米颗粒

Frank Alexis[*]，Jieming Zeng[*] 和 Shu Wang[*,†]

* Institute of Bioengineering and Nanotechnology，Singapore；[†] Department of Biological Sciences，National University of Singapore 138669

王均　译



## 摘要

聚阳离子/质粒 DNA 纳米颗粒是一种很有潜力的基因传递体系，但其低转基因效率限制了它的实际应用。提高其转基因效率的一种办法是利用对特异性细胞具有靶向能力的多肽，对颗粒进行修饰，以提高颗粒被细胞特异性摄取的能力。本章介绍了两种制备多肽功能化的聚乙烯基亚胺(PEI)/DNA 纳米颗粒的方法：①通过将多肽键合到具有氨基反应活性、经杂官能基交联剂修饰的 PEI 上，形成多肽链接的 PEI/DNA 复合物；②用带正电荷、具有和 DNA 静电相互结合能力的靶向肽和 PEI，以及质粒 DNA 制备非键合型三元复合物。支化 PEI 分子，其化学结构有利于靶向多肽的偶联，能在单一 PEI 分子链上接多个多肽分子。此方法的技术难点在于如何选择一种可以溶解在 PEI 溶液中并保持稳定性的偶联剂。另一个技术难点在于有时 PEI 的活化容易导致 PEI 分子的交联。这种靶向肽修饰的 PEI/DNA 纳米颗粒具有一定的细胞特异性，从而增强在靶细胞中的转基因效率，同时也减少了外源基因在非目标细胞中的表达，从而降低其副作用。此外，也可以将能促进内含体逃逸或细胞核穿透的特殊多肽整合到 PEI/DNA 纳米颗粒，增强基因的表达。除了偶联所采用的化学反应可能造成蛋白质、多肽的失活外，对于较难纯化或合成的蛋白质或多肽分子，由于化学偶联需要的原材料较多，花费昂贵，大量制备受到限制，在基因治疗的应用中具有一定困难。三元复合物的制备有助于解决上述问题，然而，体系中存在靶向肽和 PEI 对 DNA 的竞争性结合，因此需要对 DNA/多肽/PEI 的比例进行合理优化。

## 引言

PEI 由于其聚阳离子的本质，它和带负电的 DNA 分子通过静电相互作用形成纳米颗粒，进一步帮助 DNA 通过胞外及胞内的屏障。最近，发展受体介导的内吞、内含体逃逸以及核靶向转基因载体材料引起了广泛的重视，其中典型的方式是将功能分子通过化学键偶联到阳离子型聚合物上，实现 DNA 到靶细胞的选择性输送。如转铁蛋白、半乳糖、抗体和 RGD 多肽等靶向分子，均可以通过和高分子基因载体形成稳定的共价键、二硫键或可酶解的化学键实施基因的靶向输送（Hildebrandt et al. 2003；Kunath et al. 2003a，b；Kursa et al. 2003；Tang et al. 2003；Strehblow et al. 2005）。相应地，功能分子也可以通过非共价键复合到 PEI/DNA 纳米颗粒。例如，嵌合靶向区域和 DNA 结合序列的多肽具有静电结合 DNA 的能力，如果再加入 PEI 分子，可以形成三元复合物，其中 DNA 结合序列可以是源于组蛋白 H1 的 SPKR 重复序列或是赖氨酸重复序列（Rudolph et al. 2003；Ma et al. 2004；Zeng and Wang 2005）。

本章介绍了用于靶向基因传递的 PEI/DNA 纳米颗粒的制备方法。这些纳米颗粒能增强基因载体进入靶细胞的能力，同时降低非目标细胞对其的吞噬，因而增强基因传递的效率。我们在这里将介绍：①靶向肽对 PEI 的化学键合；②DNA 复合物的制备，包括靶向肽化学键合 PEI、非靶向肽偶联 PEI 和 DNA 的复合物；③细胞转染实验。

## 方案

# PEI/DNA 纳米颗粒的制备和转染

多肽偶联到 PEI 分为两步。首先用具有氨基反应活性的交联剂对 PEI 进行修饰，修饰后的 PEI 进一步和多肽的官能基，如羧基或巯基反应。选用杂双官能基的偶联剂可以减少反应过程中的副反应。本文使用 SMCC 作为杂双官能基偶联剂，在 PEI 和含有巯基的多肽间形成稳定的化学键。

## 材料

### 试剂

二甲基亚砜（DMSO；Sigma-Aldrich）

DMEM（Dulbecco's modified Eagles's medium）细胞培养基，含 10%胎牛血清（FBS）

氯化锂（LiCl，Sigma-Aldrich）

萤光素酶检测试剂（Promega）

哺乳动物细胞（指数增长期）

无血清 Opti-MEM 细胞培养基（Invitrogen）

PEI 聚合物（M. W. 600～1000kDa，Fluka；M. W. 750kDa、25kDa、2kDa 和 800Da，Sigma-Aldrich；M. W. 1.2kDa、10kDa 或 70kDa，Polysciences）

多肽，固相化学合成方法制备

磷酸盐缓冲液（PBS）

0.1mol/L 磷酸钠盐缓冲溶液（pH 7.4）

0.15mol/L NaCl

质粒 DNA，编码萤光素报道基因

5×报道基因裂解缓冲液（Promega），用 PBS 稀释成 1 倍液

SMCC [succinimidyl-4-( *N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate]（Pierce）

超纯水

### 仪器

$D_c$ 蛋白质检测试剂盒（Bio-Rad）

透析膜

冻干机

萤光素酶检测仪

磁力搅拌器和磁子

反应瓶

组织培养瓶

## 方法

### 用交联剂活化 PEI

1. 准备 SMCC 储存液（50mmol/L，溶于 DMSO）

   SMCC 易水解。在干燥 $N_2$ 保护下用无水 DMSO 配置储存液。4℃下储存液可以稳定存储 3 个月。步骤 1～10 操作需要在化学通风橱中进行，遵循化学安全操作规范。

2. 用 DMSO 配制 10mg/ml 的 PEI 溶液。加入 2～5mg LiCl 增加 PEI 的溶解性。
3. 用注射器将 SMCC 缓慢加入到 PEI 溶液中，室温下反应 2h。

   SMCC 溶液的用量按所需要的 SMCC 和 PEI 摩尔比计算。

4. 在超纯水中将修饰后的 PEI 透析 2d，每天换水至少 5 次。
5. 收集透析袋中的溶液，样品冻干。

### 偶联活化的 PEI 和多肽

6. 用 PBS 作溶剂溶解多肽，制备 20～50mmol/L 的溶液。
7. 用 PBS 作溶剂溶解活化的 PEI（步骤 5），制备 10mg/ml 的溶液。
8. 将多肽溶液缓慢加入到活化的 PEI 中，室温下反应 24h。

   多肽的用量取决于最终需要的偶联的摩尔比例。

9. 将多肽偶联后的 PEI 在超纯水中透析 2d，每天换水至少 5 次。
10. 收集透析袋中的溶液，样品冻干。

### 制备 PEI/DNA 的复合物

11. 配制储存液

a. 在超纯水中配置 1mg/ml 的质粒 DNA 的储存液。

b. 配置 PEI（步骤 5）的储存液，或者多肽偶联的 PEI（步骤 10）的储存液，其中氨基 N 的含量为 10nmol/ml（pH 7.2）。

c. 制备三元复合物，需要在超纯水中配制 5mg/ml 的含有 DNA 结合序列的靶向肽的储存液。步骤 11～22 需要在无菌环境下使用灭菌的试剂，室温下在平流的超净台中制备复合物。

12. 配制工作液

a. 将 1μg 的质粒 DNA 稀释到 50μl 的无血清 Opti-MEM 中（用于转染 24 孔板中的细胞）。

b. 用 50μl 无血清 Opti-MEM，稀释含合适量的 PEI 或多肽偶联的 PEI。

c. 制备三元复合物，用 50μl 无血清 Opti-MEM 稀释含合适量的多肽。

13. 在蜗旋振荡下，将多肽偶联的 PEI 逐滴加入到 DNA 溶液中。对于三元复合物，在蜗旋振荡时，将多肽逐滴加入到 DNA 溶液中。

14. 室温培养 30min。

多肽偶联的 PEI/DNA 复合物也可以直接用于转染（步骤 16）。

15. 制备三元复合物，在蜗旋振荡下，将 PEI 溶液逐滴加入到靶向多肽/DNA 复合物溶液中，室温下培养 30min。

三元复合物也可以直接用于转染（步骤 16）。

## 转染检测

16. 转染前一天，将哺乳动物细胞按每孔 50 000 的密度接种到 24 孔板中，使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基，在 37℃，5% $CO_2$ 下培养 24h。

17. 吸除培养基，用 PBS（37℃预热）将细胞清洗 2 遍。

18. 按顺序进行如下操作：

每孔加入 100～150μl 无血清 Opti-MEM；

每孔加入 100～150μl DNA 复合物，含 1μg 质粒 DNA（步骤 14 或 15）

37℃，5% $CO_2$ 下培养细胞 4h。

19. 吸除转染溶液。用 PBS（37℃预热）清洗 2 遍。加入 1ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基，培养细胞 24～48h。

20. 检测萤光素酶的表达。每孔加入 100μl 的 1×报道基因裂解缓冲液，裂解细胞。

21. 为了检测萤光素酶的活性，将 20μl 细胞裂解液加入到 100μl 萤光素酶检测试剂中，用萤光素酶检测仪检测萤光素酶的活性。

22. 为了归一化萤光素酶活性，用 $D_c$ 蛋白质检测试剂盒来测定细胞裂解液中的蛋白质含量。

## 致谢

新加坡 A*STAR 和新加坡生物工程与纳米技术研究所。

# 参考文献


Hildebrandt I.J., Ayer M., Wagner E., and Gambhir S.S. 2003. Optical imaging of transferrin targeted PEI/DNA complexes in living subjects. *Gene Ther.* **10:** 758–764.

Kunath K., Merdan T., Häberlein H., and Kissel T. 2003a. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J. Gene Med.* **5:** 588–599.

Kunath K., von Harpe A., Fischer D., and Kissel T. 2003b. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: Degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. *J. Control. Release* **88:** 159–172.

Kursa M., Walker G.F., Roessler V., Ogris M., Roedl W., Kircheis R., and Wagner E. 2003. Novel shielded transferring-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor targeted gene transfer. *Bioconjug. Chem.* **14:** 222–231.

Ma N., Wu S.S., Ma Y.X., Wang X., Zeng J., Tong G., Huang Y., and Wang S. 2004. Nerve growth factor receptor-mediated gene transfer. *Mol. Ther.* **9:** 270–281.

Rudolph C., Plank C., Lausier J., Schillinger U., Muller R.H., and Rosenecker J. 2003. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem.* **278:** 11411–11418.

Strehblow C., Schuster M., Moritz T., Kirch H.C., Opalka B., and Petri J.B. 2005. Monoclonal antibody-polyethylenimine conjugates targeting Her-2/*neu* or CD90 allow cell-type specific nonviral gene delivery. *J. Control. Release* **102:** 737–747.

Tang G.P., Zeng J.M., Gao S.J., Ma Y.X., Shi L., Li Y., Too H.P., and Wang S. 2003. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: Effects of PEGylation extent. *Biomaterials* **24:** 2351–2362.

Zeng J. and Wang S. 2005. Enhanced gene delivery to PC12 cells by a cationic polypeptide. *Biomaterials* **26:** 679–686.

# 第四十四章　用于核酸传递的含环糊精的聚阳离子

Jeremy D. Heidel
Calando Pharmaceuticals，Pasadena，California 91107
王均　译



## 摘要

大量非病毒体系已经被用于体外培养细胞或体内特定细胞的核酸传递。它们在毒性、免疫原性和靶向特定细胞表面受体或细胞种类的能力等方面具有很大差异。一类含有β-环糊精的线性阳离子聚合物在体内核酸传递中展现出了良好的效果，这些核酸包括质粒 DNA、DNAzyme 和小干扰 RNA。这类聚合物和核酸形成复合物（polyplex），并且可以进一步进行靶向配体（如转铁蛋白）的修饰，以促进高表达同源受体细胞对复合物的优先摄入。这里介绍这类材料的背景知识和它们在体内外应用的方式。

## 引言

核酸（NA）作为治疗药物具有巨大的潜力，但很大程度上还没有被开发实现。究其原因，并不是因为对相关过程中的分子机制了解不足，也不是因为不具备设计和制备合适核酸分子的能力，而是因为核酸传递过程中在细胞和亚细胞水平存在大量屏障，能克服这些屏障实施高效核酸输送的材料却非常少。许多研究人员在发展和理解核酸药物载体方面取得了显著进展。这些载体分为病毒和非病毒两大类。典型的非病毒载体包括阳离子型脂质体、合成高分子，它们都具有正电性并通过静电和核酸分子相互作用。

聚乙烯亚胺（PEI）和聚赖氨酸（PLL）是两种最常用的用于核酸传递的聚阳离子，在第四十二、四十三和五十一章已经进行了详细阐述。20 世纪 90 年代中期，加州理工大学的 Mark Davis 博士的研究小组以环状寡聚葡萄糖，也就是环糊精分子为基础，

发展了一类新型聚阳离子核酸药物载体。环糊精是一种能高剂量使用的小分子药物增溶剂，在 Mark Davis 小组的研究中，环糊精分子被官能化，聚合成为高分子的主链组成单元，生成含有环糊精的聚阳离子（CDP）。将 CDP 加入到核酸溶液中，它可以自发地和核酸分子作用形成 CDP-NA 复合物，从而帮助核酸分子进入细胞（Gonzalez et al. 1999）。在该工作的基础上，他们还进行了大量的相关工作，系统地研究了 CDP 的结构与功能的关系，包括糖的尺寸、种类、价电中心以及价电中心之间的间距等（Hwang et al. 2001；Popoelarski et al. 2003；Reineke and Davis 2003a，b）。此外，在环糊精的两端引入咪唑基团（im-CDP）（图 1）可以减少复合物进入内含体后的酸化，从而有助于核酸分子在细胞内的释放（Hwang 2001；Davis et al. 2004；Kulkarni et al. 2005）。

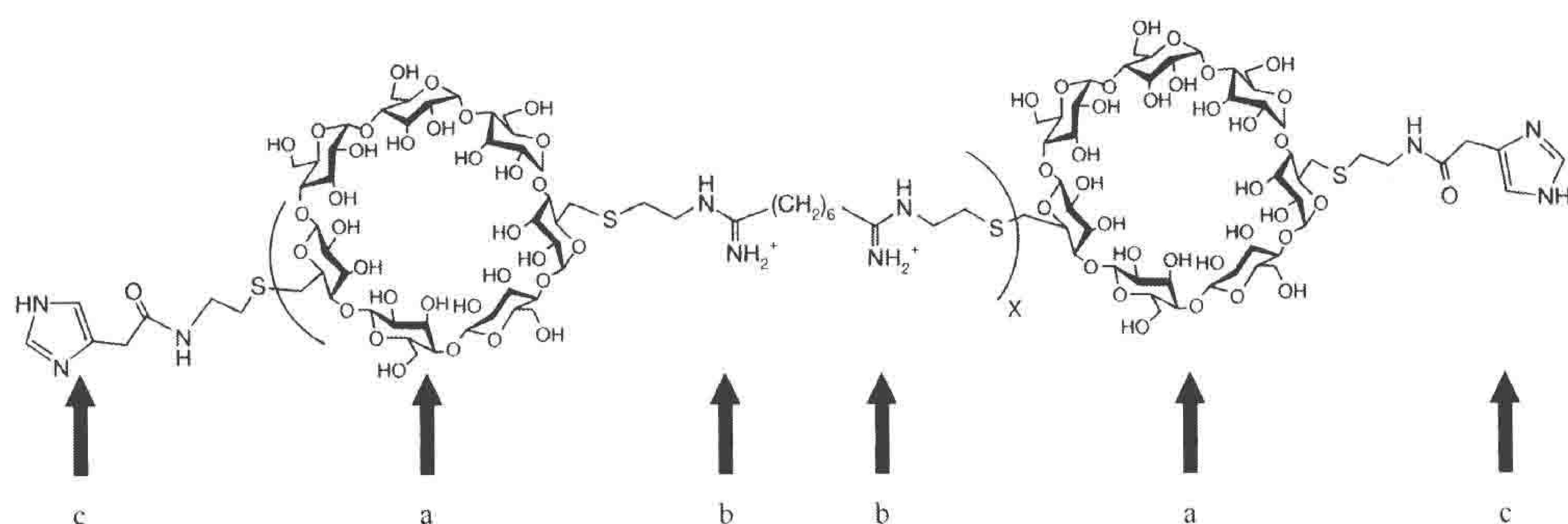



图 1. 端基为咪唑基的 CDP（im-CDP）的结构和功能。β-环糊精基团（a）降低毒性并且为进一步修饰提供位点。脒基（b）提供正电荷，结合电负性的核酸。两端的咪唑基团（c）缓冲含 polyplex 的内含体酸性环境，增强核酸在胞内的释放。

这些 im-CDP-NA 复合物（polyplex）可用于转染体外培养的细胞并实现核酸的功能（如转基因表达）。然而，与 PEI 和 PLL 的复合物类似，在体内应用中，需要加入其他的组分赋予其在生理环境下的稳定性。这一种组分便是电中性聚合物聚乙二醇（PEG）。im-CDP 中的 β-环糊精基团可以通过特殊的非共价方式将 PEG 插入到 CDP-NA 复合物中。β-环糊精具有杯状的三维结构和一个相对疏水的内腔，从而可以和足够疏水的小分子形成非共价结合的超分子复合物。小分子金刚烷（AD）就是其中一种能和 β-CD 在水溶液中形成具有很强相互作用的超分子复合物。将 AD 分子偶联到线性 $PEG_{5000}$ 的一个链末端，生成键合物 AD-PEG，然后将 AD-PEG 和 im-CDP 混合并加入到 NA 溶液中，形成三元复合物。这种三元复合物除了可以保护复合的 NA 分子避免被血清中的核酸酶降解外，在生理环境中也不再发生聚集（Pun and Davis 2002）。

上述核酸载体体系也可通过引入靶向配体来增强复合物在特定靶细胞或组织中的摄取。具体的做法是通过共价键将糖基或蛋白质等配体连接到 AD-PEG 键合物的另一个末端，得到 AD-PEG-配体分子。这样构建的含有乳糖（Heidel 2005）、转铁蛋白（Bellocq et al. 2003；Pun et al. 2004；Hu-Lieskovan et al. 2005）的载体体系成功地促进了细胞的吞噬，并在体内有效实现了核酸的功能。在上述体系中引入其他的配体，如单链片段抗体和完整的抗体分子的研究工作正在进行中。

与传统的转染方法相比，CDP-NA 具有许多优点。首先，无论是 NA 的复合，还是复合物的稳定性或靶向修饰均为非共价作用；其次是复合物构建完全通过自组装来实现（图 2）。因此，尽管组装后生成的复合物尺寸太大不能被肾脏清除，但是形成复合物的每一组分（CDP、AD-PEG 键合物、核酸）尺寸均在 5nm 以下，可以有效地被肾脏清除，从而减少复合物解离后可能造成的毒副作用。实际上，将上述含有质粒的复合物以高达 550mg/kg 的剂量静脉注射到小鼠体内（相当于 40mg/kg pDNA，25g 小鼠）都没有观察到明显的毒性（Pun et al. 2004）。此外，与脂质体转基因载体和病毒载体相比，基于 CDP 的高分子复合物载体没有免疫原性，这一优点允许重复注射上述复合物，最多时在 4 周内成功地注射了 9 次含有 siRNA 的上述复合物（Hu-Lieskovan et al. 2005）。最后，如果靶细胞类型改变，只需要对 AD-PEG-配体这一单一组分进行合适的改变，来调控细胞对复合物的摄取。以下内容将介绍用于体内和体外应用的 im-CDP-NA 复合物的制备过程。

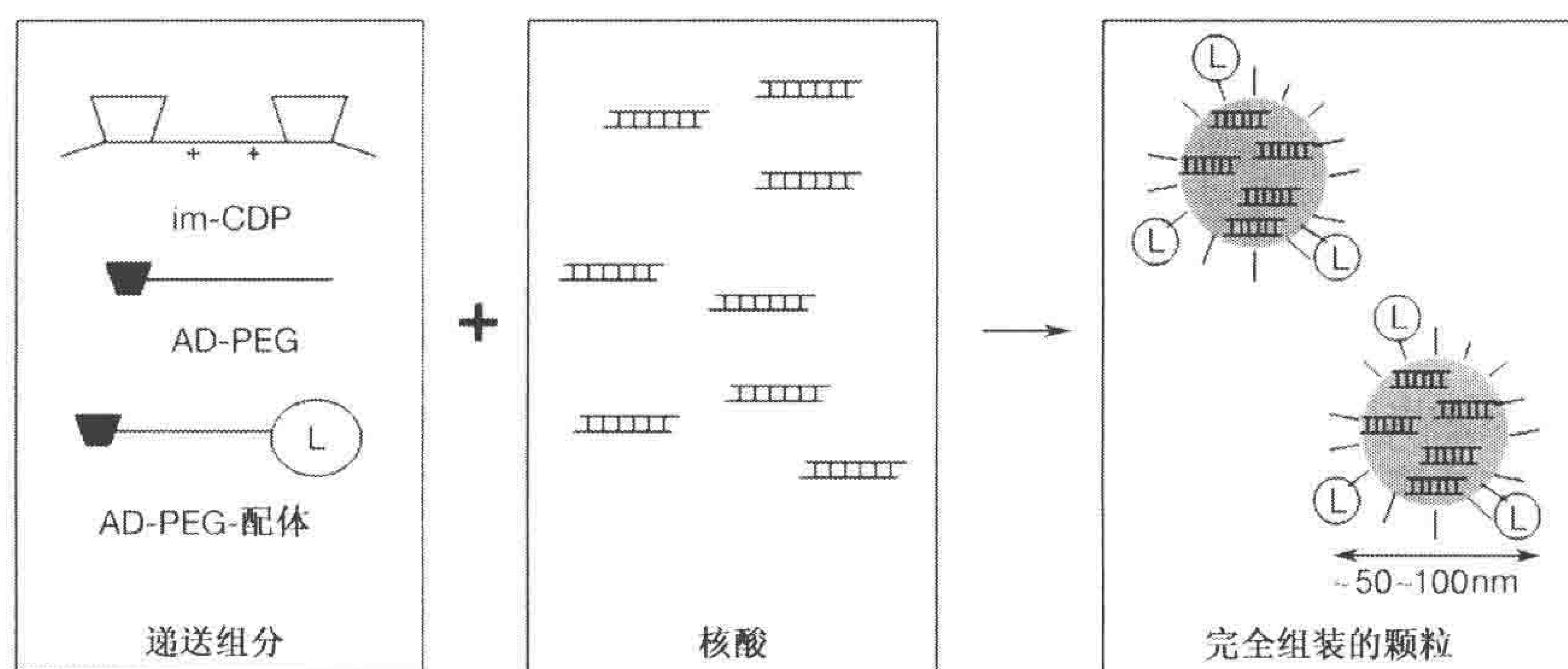



图 2．含有 NA 的复合物颗粒的自组装过程。将三种合成组分（im-CDP、AD-PEG 和 AD-PEG-配体）的水溶液加入到 NA 的溶液中自发组装形成稳定具有靶向能力的含 NA 的颗粒。

## 方案 1

## CDP 用于体外转染

对于体外转染实验，盐稳定性和细胞靶向没有必要考虑，所以 polyplex 仅含有 CDP 聚阳离子和核酸两个组分，而不包含 AD-PEG 键合物。典型的 DNA 传递实验中，用每孔 1μg 的质粒 DNA 进行实验（6 孔板每孔 DNA 用量为 5μg）。而在典型的 siRNA 传递实验中，siRNA 浓度为 20nmol/L（在 24 孔板中，相当于在每孔 200μl 转染液中加入 53.2ng siRNA）。在所有的体外实验中，无论核酸的种类或剂量，CDP 和核酸都按大约 6∶1 的质量比或者更高的比例混合（电荷比为 3∶1 +/—或更高）。

### 材料

**注意**：标有＜ !＞的材料的处理方法见附录。

## 试剂

完全培养基（含抗生素和血清），针对细胞类型进行合理选择

含有环糊精的聚阳离子（CDP；20mg/ml）

冻干后的固体溶于不含 DNase 和 RNase 的水中。储液为无色。

核酸（80μmol/L）

DNAzyme（Eurogentec）

质粒 DNA（pDNA）

小干扰 RNA（siRNA）（Dharmacon，Integrated DNA Technologies）

用细菌 DH5α（Invitrogen）扩增 pDNA，纯化使用 Novagen's UltraMobius 1000 试剂盒。DNAzyme 和 siRNA 为化学合成，经高效液相色谱（HPLC）纯化，并用凝胶电泳验证。核酸用不含 DNase 和 RNase 的水，或者不含 RNase 的乙酸钾缓冲液溶解。

Opti-MEM I 低血清培养基（Invitrogen）

磷酸盐缓冲液（PBS，灭菌）

胰酶<!>

## 仪器

细胞培养板（6 孔或 24 孔）

细胞培养箱（37℃，5% $CO_2$）

## 方法

1. 转染前一天，胰酶消化并收获指数增长期的贴壁细胞。将细胞接种到 6 孔或 24 孔板中，细胞密度 24 孔板中为每孔 $5\times10^4$ 个细胞，6 孔板中为每孔 $2.5\times10^5$ 个细胞。
2. 每孔加入 1ml（24 孔板）或 5ml（6 孔板）的完全培养基，在细胞培养箱中 37℃，5% $CO_2$ 下培养 24h。
3. 配制复合物溶液：将 1 倍体积的 CDP 储存液（典型的 10μl 每孔）加入到等体积的核酸储存液中。

   对于体外转染，核酸浓度如高于 0.2mg/ml，会导致核酸不能被等体积的 CDP 溶液完全结合。这种情况下混合液通常为不透明或乳状，而且基因表达或基因敲除效果差。
4. 在每体积复合物溶液中加入 9 体积的 Opti-MEM（24 孔板中每孔加入 180μl Opti-MEM）。
5. 从孔中吸出完全生长培养基。用 0.5ml PBS 洗涤细胞。
6. 每孔加入 200μl（24 孔板）或 1000μl（6 孔板）的复合物/Opti-MEM 的混合液。将培养板放回培养箱中培养 4h。
7. 从孔中吸除复合物/Opti-MEM 的混合液。加入 1ml（24 孔板）或 5ml（6 孔板）的完全培养基。
8. 在适当的时间，进行基因表达或基因敲除的检测。

## 方案 2

# 用 CDP 进行体内转染

用 CDP 进行体内转染时，盐稳定性和细胞靶向能力对于转染能否成功至关重要，因此在这一过程中需要加入 AD-PEG（未修饰的 AD-PEG 和 AD-PEG-配体）。AD-PEG-配体的用量取决于多种因素，包括它对复合物的稳定能力（受配体的尺寸和电荷影响），以及相应靶细胞表面受体的密度等。有些靶向配体可能尺寸较大，或含有净电荷，使得整合这些分子到复合物中较为困难。核酸的使用剂量取决于核酸及实验的种类。对于典型的小鼠静脉注射实验，每只动物最高剂量可达 5mg/kg（相当于每 20g 小鼠注射 100μg）pDNA。DNAzyme 和 siRNA 的剂量可高达 50mg/kg（相当于每 20g 小鼠注射 1mg DNAzyme）和 5mg/kg（相当于每 20g 小鼠注射 100μg siRNA）。

## 材料

### 试剂

金刚烷-PEI（50mg/ml）

AD-PEG，乳糖封端（AD-PEG-Lac）

AD-PEG，不含配体（AD-PEG）

AD-PEG，偶联转铁蛋白（AD-PEG-Tf）

冻干后的固体溶于不含 DNase 和 RNase 的水中。储液为无色（AD-PEG 和 AD-PEG-Lac）或红色/橙红（AD-PEG-Tf）。

含有环糊精的聚阳离子（CDP，20mg/ml）

冻干后的固体溶于不含 DNase 和 RNase 的水中。储液为无色。

D-葡萄糖（10% *m*/*V*，溶于水中 [$D_{10}W$]）

将葡萄糖溶于不含 DNase 和 RNase 的水中，0.2μm 的微孔滤膜过滤。所有体内实验中，注射液葡萄糖溶液终浓度均为 5%。

小鼠（20g）

核酸（80μmol/L）

DNAzyme（Eurogentec）

质粒 DNA（pDNA）

小干扰 RNA（siRNA）（Dharmacon，Integrated DNA Technologies）

用细菌 DH5α（Invitrogen）扩增 pDNA，纯化使用 Novagen's UltraMobius 1000 试剂盒。DNAzyme 和 siRNA 为化学合成，经高效液相色谱（HPLC）纯化，并用凝胶电泳验证。核酸用不含 DNase 和 RNase 的水，或者不含 RNase 的乙酸钾缓冲液溶解。

### 仪器

27 号针头

1ml 注射器

## 方法

1. 将 CDP、AD-PEG 和 AD-PEG-配体在水中混合，最终 AD：β-CD 的摩尔比为 1∶1。
2. 将上述溶液（约 50μg/20g 小鼠）加入到等体积的核酸溶液中。
3. 加入一体积（约 100μg/20g 小鼠）无菌 $D_{10}W$ 到等体积的上述复合物溶液中。
4. 用带有 27 号针头的 1ml 注射器吸取上述复合物溶液。
5. 将小鼠的尾静脉预热。
6. 在 2～3s 内将复合物溶液注射到尾静脉中。

## 致谢

作者要感谢 Caltech 的 Mark Davis 博士，这些聚阳离子和 AD-PEG 的主要发明人。在他的实验室作者学习了这些材料的合成、表征及相关工作。作者还要感谢 Dr. Davis 实验室现在的成员对本工作的贡献，他们包括 Suzie Pun，Nathalie Belllocq，Theresa Reineke，Swaroop Mishra 和 Derek Bartlett。

## 参 考 文 献

Bellocq N.C., Pun S.H., Jensen G.S., and Davis M.E. 2003. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **14:** 1122–1132.

Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., and Heidel J.D. 2004. Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers. *Curr. Med. Chem.* **11:** 1241–1253.

Gonzalez H., Hwang S.J., and Davis M.E. 1999. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **10:** 1068–1074.

Heidel J.D. 2005. "Targeted, systemic non-viral delivery of small interfering RNA in vivo." Ph.D. thesis. California Institute of Technology, Pasadena.

Hu-Lieskovan S., Heidel J.D., Bartlett D.W., Davis M.E., and Triche T.J. 2005. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **65:** 8984–8992.

Hwang S.J. 2001. "Rational design of a new class of cyclodextrin-containing polymers for gene delivery." Ph.D. thesis. California Institute of Technology, Pasadena.

Hwang S.J., Bellocq N.C., and Davis M.E. 2001. Effects of structure of β-cyclodextrin-containing polymers on gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **12:** 280–290.

Kulkarni R.P., Mishra S., Fraser S.E., and Davis M.E. 2005. Single cell kinetics of intracellular, nonviral, nucleic acid delivery vehicle acidification and trafficking. *Bioconjug. Chem.* **16:** 986–994.

Popielarski S.R., Mishra S., and Davis M.E. 2003. Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 3. Cyclodextrin type and functionalization. *Bioconjug. Chem.* **14:** 672–678.

Pun S.H. and Davis M.E. 2002. Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjug. Chem.* **13:** 630–639.

Pun S.H., Tack F., Bellocq N.C., Cheng J., Grubbs B.H., Jensen G.S., Davis M.E., Brewster M., Janicot M., Janssens B., Floren W., and Bakker A. 2004. Targeted delivery of RNA-cleaving DNA enzyme (DNAzyme) to tumor tissue by transferrin-modified, cyclodextrin-based particles. *Cancer Biol. Ther.* **3:** 641–650.

Reineke T.M. and Davis M.E. 2003a. Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 1. Carbohydrate size and its distance from charge centers. *Bioconjug. Chem.* **14:** 247–254.

Reineke T.M. and Davis M.E. 2003b. Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 2. Charge center type. *Bioconjug. Chem.* **14:** 255–261.

# 第四十五章　用B型肝炎病毒外壳L蛋白制作的生物纳米胶囊

Tadanori Yamada*†, Joohee Jung*, Masaharu Seno†‡, Akihiko Kondo†§, Masakazu Ueda†‡, Katsuyuki Tanizawa*†和 Shun'ichi Kuroda*†

* Department of Structural Molecular Biology, Osaka University, Ibaraki, 567-0047, Japan; † Beacle Inc., Okayama 701-1221, Japan; ‡ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; § Faculty of Engineering, Kobe University‡, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan; Keio University, School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

王均　译



## 摘要

在酵母细胞中制备B型肝炎病毒（HBV）外壳L蛋白时，形成中空的生物纳米胶囊（BNC），通过电穿孔技术，可使它装载40kb以内的质粒DNA、小干扰RNA、药物以及蛋白质等。作为药物输送体系，这种用L蛋白形成的BNC有很多优势：其表面呈递肝特异性受体（L蛋白的前S区），无论是在体外还是在体内，BNC都能特异性将药物有效地输送到人肝来源细胞和组织；简单地将BNC的L蛋白的前S区替换成其他生物识别分子，如抗体、配合基、受体以及归巢多肽等可以实现对其他细胞和组织的靶向；最后，研究证明BNC作为B型肝炎疫苗的免疫原在人体使用上具有很好的安全性。

但BNC也存在一些缺陷。首先，BNC电穿孔并非总是有效（然而，我们最近发现脂质体能与BNC有效融合，J. Jung et al. 未发表）；其次，野生型BNC只能感染人和黑猩猩的肝脏。为方便体内实验，我们正在构建在肝脏中表达HBV受体的转基因小鼠；最后，虽然BALB/c小鼠并未显示诱导BNC抗体反应（静脉注射BNC三次，每两周一次，每次10μg，无免疫佐剂），但是发展长效可重复注射的低免疫原性的BNC十分必要。

## 引言

包括腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒在内的病毒载体和大多数非病毒载体相比，具有更高的转基因效率，因而被广泛用于基因治疗与医药科学的研究。病毒载体的一个显著性不足就是它缺乏特异性的靶向能力，而这种缺陷可能导致无法预料的副反应，如产生中和抗体、炎症、生殖细胞基因转染、癌变等。除此之外，临床上大量生产病毒载体是一个耗时费力的工作，而且在生产上，大多数生产商会对此有更多的责任考量。这些不足促使我们发展不包含病毒基因组、适合大量生产、具有高转基因效率和特异性靶向能力的基因转移方法。

HBV 是人肝特异性病毒，它含有 S、M、L 型外壳蛋白。在 1990 年左右，HBV 外壳蛋白 BNC 就已经在酵母细胞中表达，而 S 和 M 蛋白作为 B 型肝炎疫苗，在人体内具有很好的安全性（Kuroda et al. 1989，1991）。用酵母细胞表达 L 蛋白比表达 S 和 M 蛋白效率高很多，表达的 L 蛋白平均直径为 100nm，不含 HBV 基因组（Kuroda et al. 1992；Yamada et al. 2001）。L 蛋白的氨基端，尤其是 3～77 残基处（HBV [ayw]）或 14～88 残基处（HBV [adr]）称为前 S 区，它是人肝特异受体，是 HBV 感染不可缺少的序列。我们利用这一特点，用 BNC 在体内外高效传递基因和药物，并精确靶向人肝细胞（图 1）（Yamada et al. 2003）。

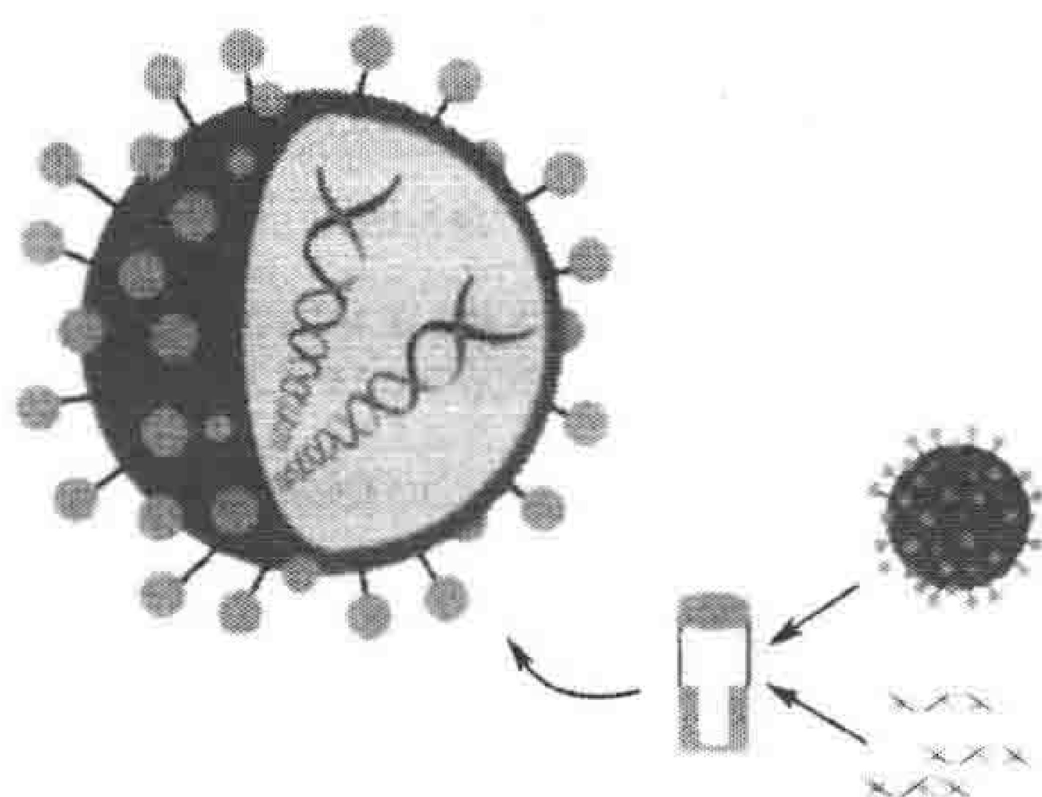


图 1. 电穿孔将核酸导入生物纳米胶囊 BNC。

## 方案

# 电极化并用 L 粒子作为生物纳米胶囊

## 材料

### 试剂

#### 待输送材料

可能的材料包括 20μg 哺乳动物绿色荧光蛋白表达质粒（如 pEGFP；Clontech）、20μg FITC 标记葡聚糖（平均分子质量 3000～10 000；Molecular Probes）、20μg FITC 标记聚苯乙烯珠子（直径 100μm 或 40nm；FluoSpheres，Molecular Probes）、20μg 纯化 GFP 或 1mmol/L 钙黄绿素（Sigma-Aldrich）。

阴性对照细胞（非人源或非肝源，如 WiDr，A431）

磷酸盐缓冲液（PBS）(见 Sambrook and Russel 2001)

纯化的 BNC 溶液

Kuroda 等在 1992 年（Kuroda et al. 1992）报道了 HBV 外壳 L 蛋白在 *Saccharomyces cere-*

visiae细胞 AH22R-中表达 pGLDLIIP39-RcT 的方法，在可溶性蛋白质中，BNC 含量大约为 40%（m/m）。超速离心纯化 BNC 的方法参考 Yamada 等（2001）。溶液（200～300μg 蛋白质/ml PBS）经消毒 0.45μm 滤膜过滤，4℃保存。反复冻融会破坏 BNC 结构。

细胞系：人肝来源细胞系（如 HepG2、HuH-7、NuE）

异种移植老鼠模型：移植癌细胞（NuE 和 WiDr，肿瘤直径约 1cm）的 BALB/c 裸鼠（nu/nu，10～11 周龄，雄性）

## 仪器

电穿孔管（4mm）

电穿孔系统（Gene Pulser II，Bio-Rad）

荧光显微镜

## 方法

### BNC 装载待输送材料

1. 将待装载 BNC 的材料与纯化的 BNC（100μg 蛋白质）用 500μl 的 PBS 混合。
2. 将混合液转移到 4mm 的电穿孔管，施加 220V 和 950μF 约 220ms。

   未装载入 BNC 的材料不必除去。

### BNC 的体内体外实验

3. 将上述制备的 BNC 直接加入培养的 $5\times10^4$ 个人肝来源细胞中，培养基含 10% 胎牛血清。当输送 DNA 时，加入 100ng BNC，其中含 20ng 质粒 DNA。转染 3d 后，用荧光显微镜观察 GFP 的表达。当用 BNC 输送非 DNA 材料时，用电穿孔处理的 BNC（小于 10μg），1d 后观察荧光。

### BNC 的体内实验

4. 将含有质粒或非 DNA 材料经电穿孔处理的 BNC 通过尾静脉注射到接种肿瘤的小鼠。3～7d 后，观察肿瘤组织中的荧光。

## 参考文献

Kuroda S., Fujisawa Y., Iino S., Akahane Y., and Suzuki H. 1991. Induction of protection level of anti-pre-S2 antibodies in humans immunized with a novel hepatitis B vaccine consisting of M (pre-S2 + S) protein particles (a third generation vaccine). *Vaccine* **9:** 163–169.

Kuroda S., Itoh Y., Miyazaki T., Otaka-Imai S., and Fujisawa Y. 1989. Efficient expression of genetically engineered hepatitis B virus surface antigen P31 proteins in yeast. *Gene* **78:** 297–308.

Kuroda S., Otaka S., Miyazaki T., Nakao M., and Fujisawa Y. 1992. Hepatitis B virus envelope L protein particles: Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **267:** 1953–1961.

Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Yamada T., Iwabuki H., Kanno T., Tanaka H., Kawai T., Fukuda H., Kondo A., Seno M., Tanizawa K., and Kuroda S. 2001. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* **19:** 3154–3163.

Yamada T., Iwasaki Y., Tada H., Iwabuki H., Chuah M.K.L., VandenDriessche T., Fukuda H., Kondo A., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., and Kuroda S. 2003. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* **21:** 885–890.

# 第四十六章　用于体外哺乳动物细胞转染的固体脂质纳米颗粒

Carsten Rudolph 和 Joseph Rosenecker
Department of Pediatrics，Ludwig-Maximilians University，80337 Munich，Germany
王均　译



## 摘要

固体脂质纳米颗粒（SLN）和阳离子脂质体以及阳离子聚合物等基因载体相比有很多技术上的优势。然而，在缺少溶内体试剂（如氯喹）的情况下，即使 SLN 载体的组分经过优化，其基因转染效率仍然比使用标准转染试剂要低。本文通过在 SLN 中掺入 HIV-1 蛋白二聚体 TAT 多肽来增加基因转染效率，结果显示掺入 TAT 的 SLN 比标准转染试剂的转染效率高，而毒性降低。

## 引言

SLN 于 20 世纪 90 年代初期发明，它采用高压均质法或用微乳法制备。从生产和管理的角度出发，高压均质法是较好的选择。SLN 由固体基材组成，它用固体脂质替换了脂质体的液态脂质。阳离子 SLN 结合 DNA 生成纳米颗粒能在体外转染哺乳动物细胞（Olbrich et al. 2001；TAbatt et al. 2004）。在上述研究中，阳离子 SLN 用热均质法制备，成分包括基本脂质 Compritol ATO 888［山俞酸（behenic acid）单、二和三酰甘油酯的混合物］或石蜡、稳定剂 Tween-80 和 Span 85 的混合物，带电荷材料 EQ1［*N*，*N*-di-(β-steaorylethyl)-*N*，*N*-dimethylammonium chloride］或 cetylpyridinium chloride。对阳离子脂质和基本脂质组分的更细致研究表明质粒 DNA 的结合、细胞毒性、转染效率都与二者的结构密切相关。细胞对双尾阳离子脂质制得的 SLN 具有很好的耐受性，而单尾脂质制得的 SLN 具有很高的细胞毒性。研究显示用 DOTAP 作为阳离子脂质、棕榈酸鲸腊酯（cetylpalmitate）为基本脂质的 SLN 比较适合作为基因载体。

与常用的阳离子脂质体以及阳离子聚合物等基因载体相比，固体脂质纳米颗粒具有一些明显的优势。制备 SLN 相对容易，无需有机溶剂（Mehnert and Msder 2001），有足以供应市场的大规模工业化生产方式（Müller et al. 2000b；Dingle and Gohla 2002）；长期储存相对稳定（Freitas and Müller 2002），可进行蒸汽灭菌（Schwarz et al. 1994）和冻干（Schwarz and Mehnert 1997）；更重要的是 SLN 具有良好的安全性（Müller et al. 2000a），毒性比 PEI 等阳离子聚合物更小（Bragonzi et al. 2000；Gebhart and Kabanow 2001；Ollbrich et al. 2001）。然而，在缺少溶内体试剂（如氯喹）的情况下，即使 SLN 载体的组分经过充分优化，其基因转染效率仍然比常用的转染试剂（如分子质量为 25 000 的 PEI）要低（Ollbrich et al. 2001；Tabatt et al. 2004）。

最新的研究发现制备 SLN 基因载体时，用 HIV-1 TAT 多肽寡聚体预压缩 DNA，可以将其转染效率提高两个数量级（Rudolph et al. 2003），其中 HIV-1 TAT 多肽的二聚体最为有效。这种效应与 HIV-1 TAT 多肽作为细胞穿透肽的独特特性（Frankel and Pabo 1988；Fawell 1994）和核定位能力（Truant and Cullen 1999）密切相关。本章描述包含 HIV-1 TAT 多肽二聚体（$TAT_2$）预压缩 DNA 的三元基因载体复合物的制备。首先在对应电荷比例为±1 的条件下，制备质粒 DNA 与 $TAT_2$ 的复合物，其表面电势约为－20mV。表面电势采用 ZataPALS/Zeta 电势分析仪（Brookhave Instruments Corporation，澳大利亚）分析，测试条件为 10 次子操作，水的黏度设为 0.89cP；F（Ka）＝1.50；温度为 25℃。这种负电荷的 $TAT_2$ 多肽 质粒 DNA 复合物能与正电荷的 SLN 通过静电相互作用进一步结合，生成核壳型三元复合物基因载体，其中，核是 $TAT_2$ 多肽与质粒 DNA 的复合物，壳层是 SLN。我们发现实验中溶液的 pH 对负电荷 $TAT_2$ 多肽与质粒 DNA 复合物的形成非常重要。这种基因载体能有效地增加转染效率，在体外与标准转染试剂相比效率更高，但毒性更低。

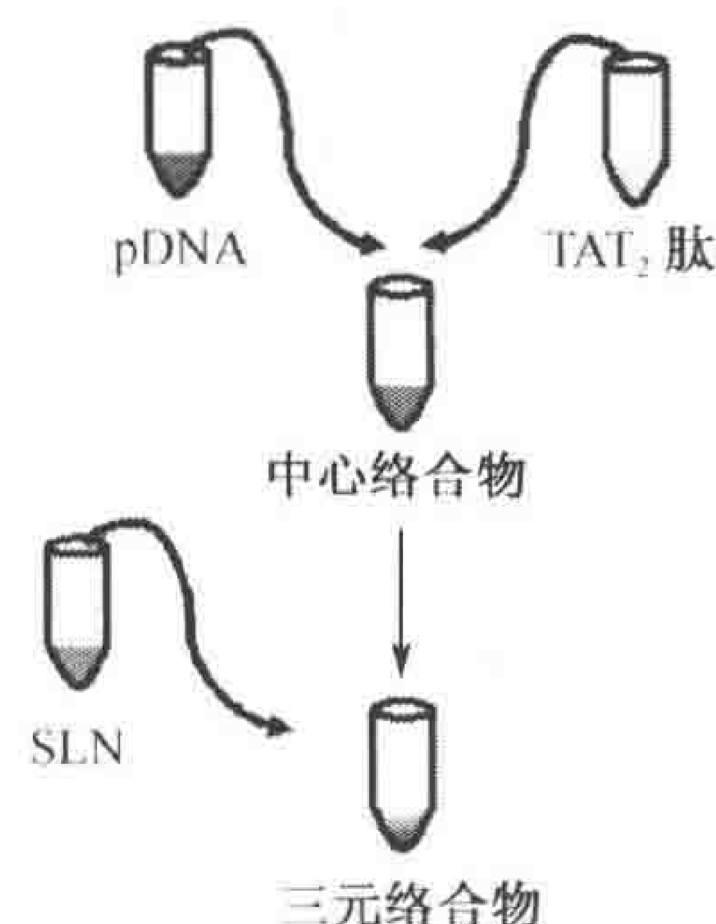


图 1. 三元 SLN 基因载体的制备。将质粒 DNA 加入到 $TAT_2$ 多肽溶液，混合，在加入 SLN 前室温培养 10min。

## 方案

# 体外转基因载体 SLN 的制备

三元 SLN 基因载体通常与支化 PEI 25kDa 的转染效率相当或更高。SLN 的一个显著优点是其毒性很低。此方法仅限于在质粒 DNA 浓度较低时使用（10μg/ml）。DNA 浓度较高的情况下，SLN 颗粒容易聚集并生成沉淀。体内实验中因为需要较高浓度的质粒 DNA，SLN 的应用受到限制。图 1 显示了三元基因载体的制备过程。

### 材料

**注意**：标有＜！＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

待转染的细胞系

无血清细胞培养基，针对合适的细胞系

胎牛血清（FCS）

庆大霉素（Invitrogen 15710-049）

HBS（HEPES 缓冲生理盐水）

150mmol/L NaCl

10mmol/L HEPES (pH 7.4)

青霉素/链霉素（GIBCO 15140-122）<!>

质粒 DNA

固体脂质纳米粒（SLN）

棕榈酸鲸腊酯（Henkel，Düsseldorf，德国）

DOTAP（Sigma-Aldrich）

Span 85（ICI Surfacants，Everberg，Belgium）

Tween-80（ICI Surfacants，Everberg，Belgium）

SLN 使用热高压均质法制备（Müller et al. 2000b）。将固体脂质加热到超过其熔点 10℃。

表面活性剂 Tween-80 和 Span 85 按 7∶3 混合。将混合物（2% *m*/*m*）与 1%（*m*/*m*）阳离子脂质 DOTAP 在热的水溶液中混合，进一步和基本脂质棕榈酸鲸腊酯（4% *m*/*m*）混合，高速搅拌 1min，形成前乳液，然后在 85℃、480bar 的压力用高压匀浆器均质化 4 次。

$TAT_2$ 多肽

$TAT_2$ 多肽序列为：$C(YGRKKRRQRRRG)_2$，富含精氨酸。$TAT_2$ 多肽按标准 Fmoc 方法用自动多肽合成仪合成，反相高效液相色谱（HPLC）纯化，并经质谱分析。游离巯基用二硫二吡啶反应进行修饰（Plank et al. 1999）。该修饰对于避免 $TAT_2$ 多肽在溶液中形成二硫键非常重要。

### 仪器

自动合成仪（431A；Applied Biosystems）

细胞培养板（24 孔）

高压匀浆器（EmulsiFlex-B3；Avestin Inc，Ottawa，Canada）

高速搅拌器（Ultra Turrax T25；Jahnke and Kunkel，Germany）

培养箱（37℃，5% $CO_2$）

反相高效液相色谱（HPLC）

## 方法

### 合成 SLN-基因载体的复合物

1. 为 24 孔板的每孔准备以下溶液。

a. 用 HBS 稀释 1μg 的质粒 DNA 至 50μl。

b. 用 HBS 稀释 0.65μg $TAT_2$ 多肽至 50μl。

c. 用 HBS 稀释 2.5μg SLN 至 50μl。

2. 制备 $TAT_2$-DNA 复合物，将质粒 DNA 溶液加入到 $TAT_2$ 溶液中。用移液管吸入吹出 10 次使其充分混合，室温下培养 10min。
3. 制备三元复合物时，将 SLN 溶液加入到 $TAT_2$-DNA 复合物中。用移液管吸入吹出 10 次使之充分混合，室温下培养 10min。

## 体外转录实验

4. 转染前一天，将细胞接种在 24 孔板，培养基含 FCS。

   细胞在转染时应该有 60%～70%的细胞密度。
5. 将每孔的细胞培养基吸出，用 850μl 的无血清培养基替代。
6. 加入 150μl SLN-基因载体三元复合物溶液（步骤 3 制得）到细胞中。37℃，5% $CO_2$ 下培养 4h。
7. 吸出转染液。用含 10% FCS、0.1%的青霉素/链霉素和 0.5%（*V/V*）庆大霉素的培养基继续培养。
8. 在指定时间检测基因转染效率。

## 致谢

感谢 Kerstin Tabatt 博士和 R. H. Müller 教授提供 SLN 制备方法，以及 Deutsche Forschungsgemeinschaft Ro994/2-1 提供的资助。

## 参考文献

Bragonzi A., Dina G., Villa A., Calori G., Biffi A., Bordignon C., Assael B.M., and Conese M. 2000. Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther.* **7:** 1753–1760.

Dingler A. and Gohla S. 2002. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): Scaling up feasibilities. *J. Microencapsul.* **19:** 11–16.

Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B., and Barsoum J. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 664–668.

Frankel A.D. and Pabo C.O. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55:** 1189–1193.

Freitas C. and Müller R.H. 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **47:** 125–132.

Gebhart C.L. and Kabanov A.V. 2001. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release* **73:** 401–416.

Mehnert W. and Mader K. 2001. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **47:** 165–196.

Müller R.H., Mader K., and Gohla S. 2000a. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—A review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50:** 161–177.

Müller R.H., Dingler A., Schneppe T., and Gohla S. 2000b. Large scale production of solid lipid nanoparticles (SLN™) and nanodispersions (DissoCubes™). In *Handbook of pharmaceutical controlled release technology* (ed. D. Wise), pp. 359–376. Marcel Dekker, New York.

Olbrich C., Bakowsky U., Lehr C.M., Müller R.H., and Kneuer C. 2001. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release* **77:** 345–355.

Plank C., Tang M.X., Wolfe A.R., and Szoka F.C., Jr. 1999. Branched cationic peptides for gene delivery: Role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum. Gene Ther.* **10:** 319–332.

Rudolph C., Plank C., Lausier J., Schillinger U., Müller R.H., and Rosenecker J. 2003. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem.* **8:** 11411–11418.

Schwarz C. and Mehnert W. 1997. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (Sln). *Int. J. Pharm.* **157:** 171–179.

Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S., and Müller R.H. 1994. Solid lipid nanoparticles (Sln) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Control. Release* **30:** 83–96.

Tabatt K., Sameti M., Olbrich C., Müller R.H., and Lehr C.M. 2004. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57:** 155–162.

Truant R. and Cullen B.R. 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin β-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 1210–1217.

# 第四十七章 PEG 化的聚左旋赖氨酸和 DNA 的纳米颗粒

Pamela B. Davis* 和 Tomasz H. Kowalczyk†

* Department of Pediatrics, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio 44106; † Copernicus Therapeutics, Inc., Cleveland, Ohio 44016

王均 译



## 摘要

PEG 化的聚左旋赖氨酸和 DNA 的纳米颗粒是水溶性的，在生理盐水和组织液中稳定存在，能转染不分裂的细胞（Liu et al. 2003），显示很小的毒性（Ziady et al. 2003b），而且在动物体内和人体内都有效（Konstan et al. 2004）。它们的制备方法简单可靠，具有可重复性。这些性能也代表了非病毒基因载体的基本优点。

## 引言

质粒 DNA 与 PEG 化聚赖氨酸自组装形成纳米颗粒的制备简单，具有可重复性，能保护 DNA 不被降解。这种纳米颗粒在 4℃下可以稳定保存几年，室温下可稳定保存几个月，在正常体温下亦可稳定保存几天。在抗冻剂存在下冻干，或用合适的雾化设备制剂化后重悬，不会造成纳米颗粒的失活。

不含任何靶向成分的上述 PEG 化 DNA 纳米颗粒在体内能转染上皮、视网膜和神经组织细胞。尽管上述纳米颗粒对大多数永生细胞株的转染无效，这也限制了其体外的应用，但对来源于上皮、视网膜和神经组织的原代培养细胞具有转染作用。这些纳米颗粒进入细胞的机制尚不明了，但一旦进入细胞后，就能进入不分裂细胞的核内并促进转基因的表达。这些特性应该与纳米颗粒的直径比核孔小有关（Liu et al. 2003）。除了其有利的物理性能、稳定性、转染不分裂细胞的能力外，体内的实验也证明这些纳米颗粒的毒性显著性低（Ziady et al. 2003b），而由于增大剂量往往是补偿基因载体低效率的重要途径，因此 PEG 化聚赖氨酸和 DNA 的纳米颗粒的无毒性的特点对其在体内的成功

应用具有特别的意义。

## 方案

# PEG 化聚左旋赖氨酸/DNA 纳米颗粒的制备和分析

本文描述 PEG 单甲醚马来酰亚胺与 $CK_{30}$ 多肽的结合，以及用生成的 PEG 化聚左旋赖氨酸与 DNA 的复合。同时，描述纳米颗粒的形态和胶体稳定性分析。虽然纳米颗粒的制备过程重复性很好，但有时也会发现产品质量的变化，如颗粒不稳定、形态不好等。特别是当质粒的来源或质粒的制备方法改变时，这些变化尤为突出。因此每次制备的纳米颗粒都要进行形态和胶体稳定性分析。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

$CK_{30}$

这种多肽氨基端为半胱氨酸，含有 30 个赖氨酸残基，通常用三氟乙酸盐固相法合成，并通过高效液相色谱（HPLC）、质谱和氨基酸定量分析表征。其纯度通常大于 95%（$CK_{28}$-$CK_{31}$ 含量），二聚体含量低于 1%。冻干多肽在氩气保护下−20℃保存一年后，快速蛋白质液相色谱和定量 4，4-二硫二吡啶分析显示纯度保持在 90%以上。

葡萄糖（5%）或 NaCl（0.9%）

二甲亚砜（DMSO）< !>

PEG 单甲醚马来酰亚胺衍生物（mPEG-MAL-10k）（分子质量 10kDa）

mPEG-MAL-10k 可以从 Nektar Therapeutics 购买。其分子质量和分散度经凝胶渗透色谱法确定。上述原料 80%的 PEG 链末端应连接有官能化马来酰亚胺基团，这可通过 $^{1}$H-NMR 分析验证。杂质含量（PEG 二聚体）应小于 10%。实验中也可以使用 5kDa 或 20kDa 的 PEG。

磷酸盐缓冲液（PBS）（0.1mol/L，pH 7.2)/EDTA（5mmol/L）（配方参考 Sambrook and Russell 2001）

质粒 DNA（0.2mg/ml 水溶液）

用细菌扩增质粒，碱裂解后用 CsCl-ethidium bromide 梯度离心纯化。然后用 0.1 体积的 3mol/L 乙酸钠和 2.5 体积的乙醇沉淀两次，并在水中重悬，浓度用紫外分光光度法测定。所获得的 DNA 用 RNase A< !>和 RNase T1 处理两次，然后重悬至终浓度为 1.5～2mg/ml。质粒制备过程中应确保没有细菌染色体 DNA 或 RNA 污染，开环和线性 DNA 含量应小于 30%。

注射用消毒水

这可以从 Baxter 买到。用于制备 DNA 和 PEG 化的多肽水溶液。

三氟乙酸（0.1%）或 50mmol/L 乙酸铵 < !>

## 仪器

琼脂糖凝胶和电泳装置
透析设备
葡聚糖 G15 柱子
分光光度计
透射电镜

## 方法

### PEG 化聚赖氨酸的制备（$CK_{30}$ PEG10k）

1. 用 4,4′-二硫二吡啶法（Grassetti and Murray 1967）测试 $CK_{30}$ 中活性巯基的含量。

   活性巯基的含量的期望值根据多肽的质量、纯度、水的含量计算，含量一般应不少于 80%。

2. 将 60μmol $CK_{30}$（三氟乙酸盐）溶于 15ml 0.1mol/L PBS（pH 7.2）/5μmol/L EDTA中。

3. 将 66μmol mPEG-MAL-10k 溶于 15ml DMSO。室温涡旋震荡下，5min 内逐滴加入到上述 $CK_{30}$ 溶液中，继续搅拌 1h。

   这个反应 mPEG-MAL-10k 应过量 10%（基于马来酰亚胺的活性）。pH 为 7 时马来酰亚胺与巯基的反应比与氨基的反应快 1000 倍（Hermanson 1996）。

4. 用 4，4′-二硫二吡啶法测试巯基含量，确保反应完全。$CK_{30}$ 的 PEG 接枝率应接近 100%。

   上述 PEG 化 $CK_{30}$ 产物仅在巯基反应了 90%以上时才能使用。

5. 用葡聚糖凝胶 G15 纯化反应产物，使用 0.1%的三氟乙酸或 50mmol/L 的乙酸铵溶液平衡凝胶柱。在 220nm 下鉴定含有多肽的流出组分，收集并冻干。

   冻干后的 PEG 化聚赖氨酸在−20℃下可保存至少 2 年。

### 纳米颗粒的制备

6. 用水重悬 $CK_{30}$ PEG10k，使终浓度为 7.1mg/ml（三氟乙酸盐）或 6.4mg/ml（乙酸盐）。

7. 将 0.9ml DNA（0.2mg/ml 的水溶液）等分，每份 100μl 加入到 0.1ml $CK_{30}$ PEG10k 的重悬液中，室温下振荡 2min。

   DNA 终浓度为 0.18mg/ml，正负电荷比为 2∶1（$NH_3^+$/$PO_4^-$）

8. 4℃下将上述样品用 5%葡萄糖或 0.9%氯化钠溶液透析，以除去游离的 $CK_{30}$ PEG10k 和未反应的 PEG。

### 纳米颗粒的分析

9. 通过透射电镜观察颗粒的形貌。所制得的纳米颗粒需满足下列规范：纳米颗粒不聚集，电子密集，当三氟乙酸作为反离子时形状为椭圆，而乙酸为反离子时为棒状；

粒子的粒径应与质粒粒径一致。

10. 琼脂糖凝胶分析颗粒。应检测不到游离或降解的 DNA，颗粒应保留在上样孔中或只是轻微向前移动。颗粒用 75% 鼠血清 37℃处理 2h，接着室温用 2.5% 胰酶处理 40min，或是用 DNase 培养，应有大于 95% 的 DNA 结构完整，尽管超螺旋 DNA 可能被切断。
11. 颗粒在生理盐水中的稳定性。室温下，3400 *g* 离心 1min，上清液在 260nm 的吸光值（$A_{260}$）与起始颗粒悬液 $A_{260}$ 的比值应该是（1±10)%。
12. DNA 浊度测定（Ziady et al. 2003a）。将颗粒悬液的表观吸收值（纵坐标）对波长（330～415nm，横坐标）均按对数坐标作图，直线的斜率应在−3.5～−4.5。

## 参考文献


Grassetti D.R. and Murray J.F., Jr. 1967. Determination of sulfhydryl groups with 2,2′- or 4,4′-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* **119:** 41–49.

Hermanson G.T. 1996. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego, California, p. 148.

Konstan M.W., Davis P.B., Wagener J.S., Hilliard K.A., Stern R.C., Milgram L.J., Kowalczyk T.H., Hyatt S.L., Fink T.L., Gedeon C.R., Oette S.M., Payne J.M., Muhammad O., Ziady A.G., Moen R.C., and Cooper M.J. 2004. Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum. Gene Ther.* **15:** 1255–1269.

Liu G., Li D., Pasumarthy M.K., Kowalczyk T.H., Gedeon C.R., Hyatt S.L., Payne J.M., Miller T.J., Brunovskis P., Fink T.L., Muhammad O., Moen R.C., Hanson R.W., and Cooper M.J. 2003. Nanoparticles of compacted DNA transfect postmitotic cells. *J. Biol. Chem.* **278:** 32578–32586.

Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Ziady A.G., Gedeon C.R., Miller T., Quan W., Payne J.M., Hyatt S.L., Fink T.L., Muhammad O., Oette S., Kowalczyk T., Pasumarthy M.K., Moen R.C., Cooper M.J., and Davis P.B. 2003a. Transfection of airway epithelium by stable PEGylated poly-L-lysine DNA nanoparticles in vivo. *Mol. Ther.* **8:** 936–947.

Ziady A.G., Gedeon C.R., Muhammad O., Stillwell V., Oette S.M., Fink T.L., Quan W., Kowalczyk T.H., Hyatt S.L., Payne J., Peischl A., Seng J.E., Moen R.C., Cooper M.J., and Davis P.B. 2003b. Minimal toxicity of stabilized compacted DNA nanoparticles in the murine lung. *Mol. Ther.* **8:** 948–956.

# 第四十八章　用于核酸传递的水溶性脂聚体及脂肽

Ram I. Mahato[*,†]，Zhaoyang Ye[*] 和 Sung Wan Kim[‡]

Departments of * Pharmaceutical Sciences and [†]Biomedical Engineering，University of Tennessee Health Science Center，Memphis，Tennessee 38163;[‡]Department of Pharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Chemistry，University of Utah，Salt Lake City，Utah 84112

王均　译



## 摘要

水溶性脂高分子和脂肽是一类非病毒基因载体，它结合了脂质材料增加 DNA 对细胞膜的通透性以及聚阳离子与 DNA 缩合并促进基因在内含体逃逸的特点。通过氯甲酸胆固醇酯与分子质量为 1800Da 的支化聚乙烯亚胺（PEI）的初级或次级胺的化学反应制备脂高分子。将 *O*-(*N*-琥珀酰亚胺基)-*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基脲四氟硼酸酯(TSTU)与石胆酸在过量二异丙基乙胺（DIPEA）存在下混合，再与人鱼精蛋白来源的多肽反应则可以制备脂肽。使用分子质量为 1800Da 的 PEI 是为了避免高分子质量 PEI 引起的毒性。

## 引言

阳离子脂质体或阳离子高分子可以和 DNA 通过静电相互作用形成复合物。作为潜在高效的非病毒性基因载体，二者都能有效转染体外培养的细胞，但在组织内很难扩散，并且对细胞具有潜在的高毒性。此外，常用的制备脂质体的方法可能产生性能不稳定的产物，并且制备时要使用有毒的有机溶剂，如氯仿。另外一类潜在的基因转染试剂是多肽。具有缩合 DNA 能力，并能帮助内含体逃逸或具备核定位信号的多肽或者单独用于基因传递，或者和阳离子脂质体和高分子一起用于基因传递，并取得了一些成功

(Mahato et al. 2005)。

结合水溶性、两亲性、脂质介导膜相互作用、内含体缓冲等概念的基因载体，是极具潜力的核酸传递材料。据此，将胆固醇与分子质量为1800Da的PEI或鱼精蛋白硫酸盐结合，我们发展了水溶性脂高分子/脂肽用于基因传输（Han et al. 2001；Mahato et al. 2001；Wang et al. 2002；Mahato et al. 2004，2005）。这些基因载体包含3个组成部分（图1）：头部、连接部分及脂质“锚”。低分子质量PEI（分子质量小于1800Da的PEI无毒性）或肽作为亲水头部与DNA结合，并促进质粒DNA（pDNA）从内含体释放至细胞质，进入细胞核。胆固醇作为疏水脂质“锚”，在水溶液环境中与亲水头部形成稳定的胶束结构，并阻止质粒DNA与红细胞、血浆蛋白质之间的相互作用。头部与脂质“锚”之间可降解的连接部分往往可以减少载体的毒性。这些脂高分子/pDNA及脂肽/pDNA复合物在体外培养及原位注射到荷瘤小鼠肿瘤后均能有效转染细胞（图2），并具有较小的毒副作用。

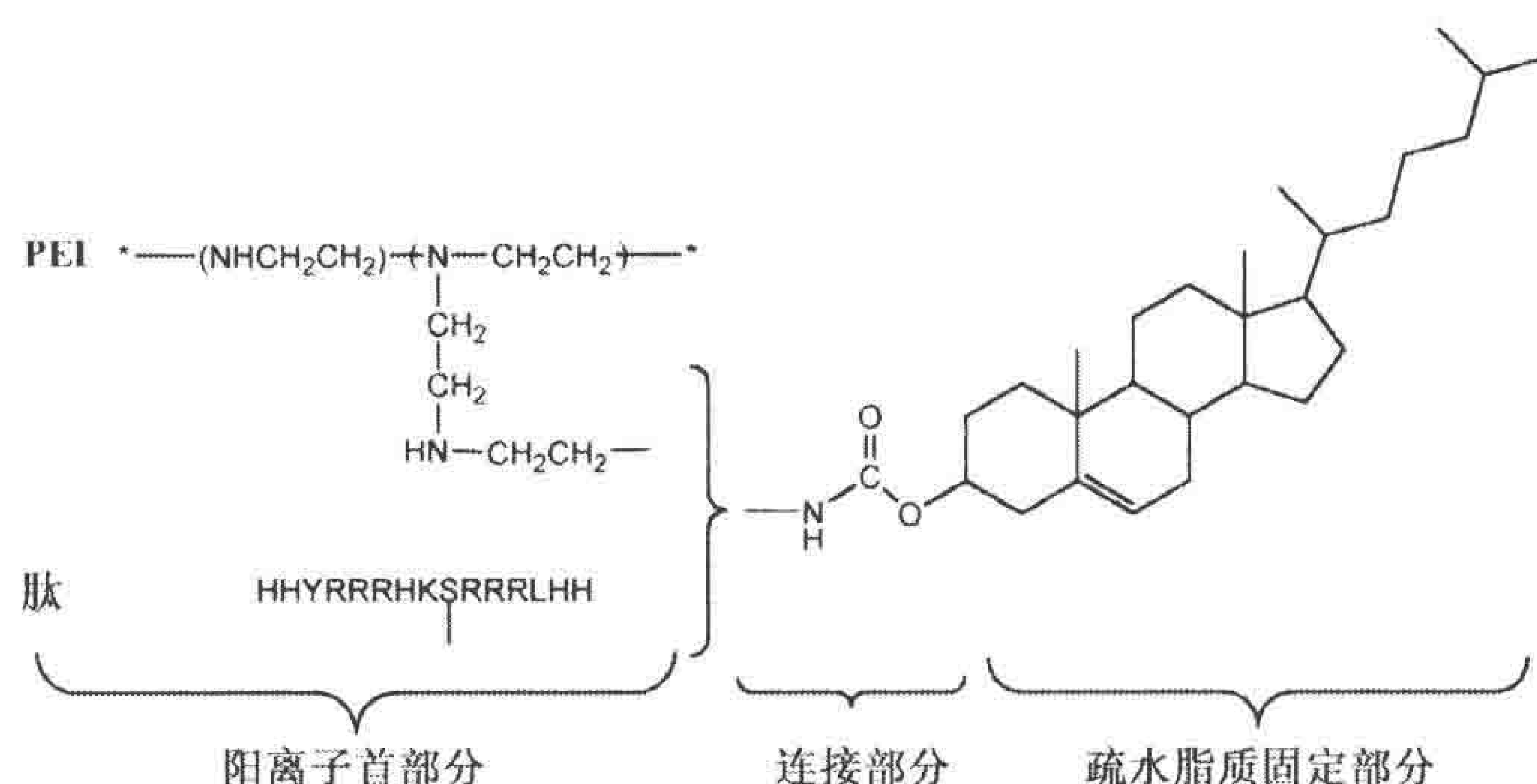



图1. 水溶性脂高分子/脂肽的基本构造。

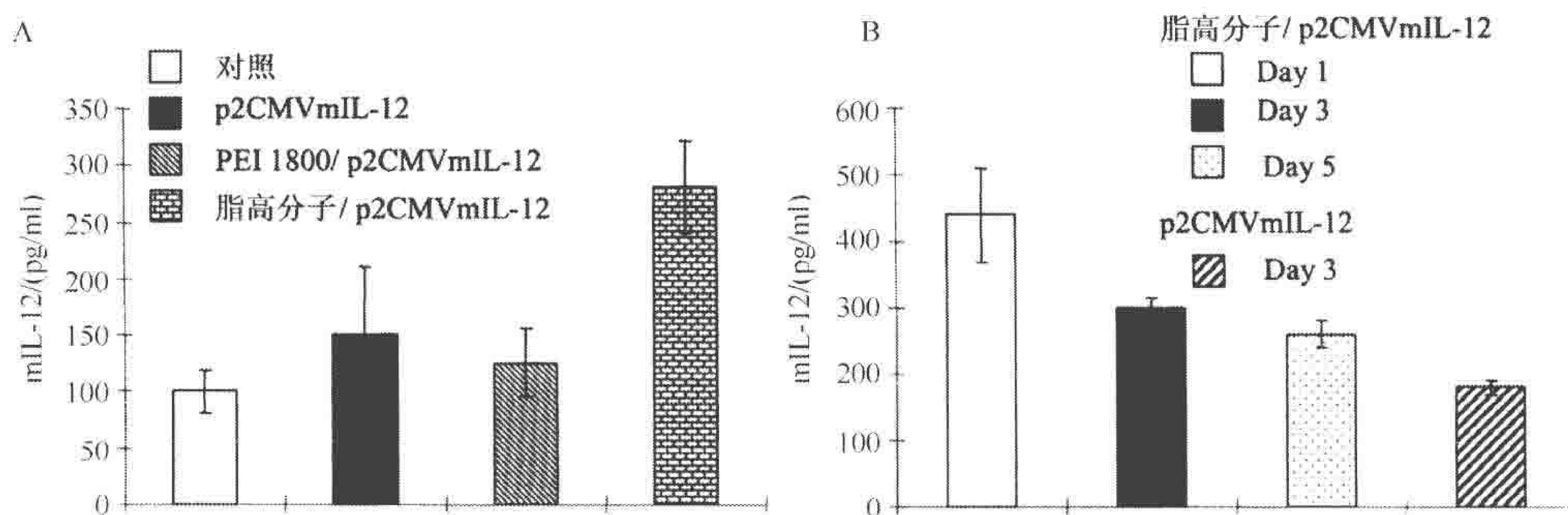



图2. 肿瘤原位注射脂高分子/p2CMVmIL-12复合物到CT-26荷瘤小鼠后的IL-12表达。A. 基因载体的影响；B. mIL-12基因表达的持续性。

## 方案

# 水溶性脂高分子/pDNA及脂肽/pDNA复合物的制备及使用

以下实验规程描述水溶性脂高分子/pDNA与脂肽/DNA复合物的制备与表征，以

及对体外培养细胞的转染及对荷瘤小鼠瘤内注射的转染。使用的治疗基因编码鼠白细胞介素-12（IL-12）亚单位 p35 与 p40，分别受独立的巨细胞病毒启动子（CMV）的转录控制，并靶向 C-26 结肠癌细胞。报告质粒包含由 CMV 启动子驱动的萤光素酶基因。实验中所使用的脂高分子/pDNA 或脂肽/pDNA 复合物均需在每次实验前新制。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

重要：所有的溶剂均为 HPLC 级

支化聚乙烯亚胺（PEI；1800Da；Polysciences）＜!＞

CT-26 结肠癌细胞

氯甲酸胆固醇酯＜!＞

乙醚＜!＞

二异丙基乙胺溶液（DIPEA；1mol/L，溶于 DMF）＜!＞

二甲基甲酰胺（DMF）＜!＞

溴化乙锭（0.5μg/ml 于 1×TBE）＜!＞

胎牛血清（FBS）

5%葡萄糖注射液

盐酸（HCl；0.1mol/L）＜!＞

石胆酸

甲醇＜!＞

二氯甲烷＜!＞

小鼠（5 周龄 BALB/c；Simonsen Laboratories）

磷酸盐缓冲液（PBS；组织培养级）

报道基因：CMV 启动子驱动的编码萤光素酶的质粒 DNA（pCMV-Luc）

RPMI 1640 组织培养基

治疗基因：p2CMVmIL-12，编码鼠 IL-2 亚单元 p35 与 p40，分别受独立的 CMC 启动子转录控制

三乙胺＜!＞

三氟乙酸（TFA；95%与 5%）＜!＞

Tris-硼酸-EDTA 缓冲溶液（TBE；商购或按配方配制，参见 Sambrook and Russell 2001）

*O*-(*N*-琥珀酰亚胺基)-*N*，*N*，*N'*，*N'*-四甲基脲四氟硼酸酯（TSTU）溶液（1mol/L 溶于 DMF）

### 仪器

琼脂糖凝胶电泳设备

联辛可宁酸（BCA）总蛋白质定量分析试剂盒（Pierce）

mIL-12 p70 酶联免疫诊断试剂盒（ELISA）（Pharmingen）

高效液相色谱仪（HPLC），包括 C18 柱（Vydac）

luminometer（Dynex Technologies）

基体辅助激光解吸电离-飞行时间质谱（MALDI-TOF）（如 Perspective Voyager-DE STR，Applied Biosystems）

核磁共振波谱仪（NMR）（Varian）

多肽合成议（如 Applied Biosystems 433A peptide synthesizer）及相关设备

标准组织培养设备及辅助设施

Zeta 电位分析仪（ZetaPALS，Brookhaven Instruments）

## 方法

### 水溶性脂高分子的合成与表征

1. 将 3g PEI（1800Da）与 100μl 三乙胺溶解于 10ml 无水二氯甲烷，于冰浴中搅拌 30min。
2. 将 1g 氯甲酸胆固醇酯溶于 5ml 冷的二氯甲烷中，缓慢加入上述 PEI 的溶液中，冰水浴中搅拌 12h。产物经干燥后，溶于 50ml 0.1mol/L 的 HCl 溶液中，过滤。
3. 用 100ml 二氯甲烷萃取上述水溶液并过滤，滤液浓缩后，沉淀于大量丙酮中，干燥。用甲醇和乙醚洗涤。
4. 通过 MALDI-TOF，以反式-4-羟基-3-甲氧基肉桂酸为基质，验证产物分子质量。用 $^{1}H$ NMR 验证其结构。该水溶性脂高分子于−20℃下可以保存 6 个月。

### 水溶性脂肽的合成与表征

5. 合成以下脂肽：His-His-Tyr-Arg-Arg-Arg-His-Cys-Ser-Arg-Arg-Arg-Leu-His-His。这一序列对应于人鱼精蛋白 51～63 的氨基酸残基，除了以赖氨酸代替 57 位半胱氨酸外，另外在氨基端与羧基端增加了组氨酸残基。肽的合成使用标准的 Fmoc 固相合成法，以 2，2，4，6，7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基（2，2，4，6，7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl，Pfp）保护精氨酸的侧基，以三苯甲基（Trt）保护组氨酸侧基，1-(4，4-二甲基-2，6-二氧杂亚环己基）3-甲基丁基［1-（4，4-dimehyl-2，6-dioxocyclohexylidene)3-methylbutyl，Dde］保护赖氨酸侧基。用叔丁氧羰基（t-Boc）保护其他氨基酸。
6. 用 5%的 TFA 处理固定于树脂上的合成多肽，使赖氨酸的 ε-氨基从 Dde 脱保护。用 100%甲醇洗几次。这一步骤得到约 50μmol 的多肽，并进行下一步反应。
7. 将 100μmol/L TSTU 溶液（1mol/L 溶于 DMF 中）逐步滴入到含 3 倍摩尔质量的 DIPEA（1mol/L 溶于 DMF 中）的 100μl 的石胆酸溶液中（1mol/L 溶于 DMF 中），室温下轻摇 2h。
8. 将步骤 6 中带有肽的树脂加入到 TSTU/石胆酸/DIPEA 混合溶液中，室温下轻摇 12h。

9. 用 DMF 洗涤反应物。室温下用 95%的 TFA 处理 90min 以使肽从树脂上断裂下来。以 1000*g* 的转速离心分离树脂。利用带反相 C18 柱的 HPLC 分离纯化肽。通过氨基酸分析确认肽的组成，并利用 MALDI-TOF 质谱测定其分子质量，测量酪氨酸在 274.5nm 的吸光值确定肽的浓度 [$\varepsilon_{274.5}$ =1400L/（mol·cm)]。

### 脂高分子/pDNA 及脂肽/pDNA/复合物的制备

10. 在 5%的葡萄糖溶液中，以 1～25 的不同 N/P 比，混合 pDNA 与脂高分子（或脂肽），室温下静置 15～20min，以制备脂高分子/pDNA（或脂肽/pDNA）复合物。

    N/P 比是指水溶性脂高分子及脂肽中 N 原子数与质粒 DNA 中磷原子的比例。

11. 于 1×TBE 中用琼脂糖凝胶电泳分析上述复合物。以 0.5μg/ml 的溴化乙锭进行染色，并在 UV 灯下观察。
12. 用 ZetaPALS 测量复合物的平均粒径及电势。

### 体外转染及萤光蛋白酶活力分析

13. 在 37℃，5%$CO_2$ 培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 CT-26 结肠癌细胞。
14. 在 6 孔板中以每孔 $3\times10^5$ 的密度接种 CT-26 细胞，使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。在细胞达到 70%密度时，用新制的脂高分子/pDNA 或脂肽/pDNA 复合物转染 CT-26 细胞，剂量为 2.5μg/孔，使用无血清的培养基。
15. 将复合物与细胞于 37℃、$CO_2$ 培养箱中培养 6h 后，用 2ml 完全培养基替换旧培养基，并继续于 37℃培养 36h。
16. 用 PBS 洗细胞。裂解细胞，用 BCA 总蛋白质定量试剂盒测定蛋白质总量。
17. 用 luminometer 测定萤光素酶的活力，并以蛋白质总量归一化 RLU 值。

### 瘤内基因传输

18. 在 5 周龄 BALB/c 小鼠左侧皮下注射 $1\times10^6$ 个 CT-26 细胞以成瘤。10～15d 后，肿瘤体积为 100～120$mm^3$。
19. 以每只荷瘤小鼠 25μg 质粒 DNA 的剂量瘤内注射 50μl 新鲜制备的脂高分子/p2CMVmIL-12 或脂肽/p2CMVmIL-12 复合物。注射 p2CMVmIL-12 裸 DNA 及 5%葡萄糖作为对照。
20. 单次瘤内注射后，观测小鼠肿瘤生长情况。在 48d 内，记录肿瘤体积的变化。
21. 注射 48h 后分离肿瘤组织，将肿瘤组织切成小片，37℃培养 24h，通过 ELISA 分析培养液中 mIL-12 p70 的浓度。

## 致谢

感谢 Dong-an Wang，Sang-oh Han 及 Anurag Maheshwari 完成上述实验。

# 参考文献

Han S.O., Mahato R.I., and Kim S.W. 2001. Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **12:** 337–345.

Mahato R.I., Han S.O., and Furgeson D.Y. 2004. Cationic lipopolymer as biocompatible gene delivery agent. U.S. Patent no. 6,696,038 B1.

Mahato R.I., Maheshwari A., and Kim S.W. 2005. Soluble steroidal peptides for nucleic acid delivery. U.S. Patent no. 6,875,611 B2.

Mahato R.I., Lee M., Han S.O., Maheshwari A., and Kim S.W. 2001. Intratumoral delivery of p2CMVmIL-12 using water-soluble lipopolymers. *Mol. Ther.* **4:** 130–138.

Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Wang D.A., Narang A.S., Kotb M., Gaber A.O., Miller D.D., Kim S.W., and Mahato R.I. 2002. Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery. *Biomacromolecules* **3:** 1197–1207.

# 第四十九章　用于DNA传递的阳离子多糖

Ira Yudovin-Farber，Hagit Eliyahu 和 Abraham J. Domb
Department of Medicinal Chemistry and Natural Products，School of Pharmacy，Faculty of Medicine，The Hebrew University of Jerusalem，Jerusalem 91120，Israel
王均和许严伟　译



## 摘要

聚阳离子是一类有效的非病毒基因传递载体。这些载体因分子质量、化学结构、聚合物/DNA 比例、分子结构而异，具备键合靶向基团的能力。这些载体能与不同的质粒复合，并将其转染至各种细胞中，从而高效地表达目的蛋白质。阳离子多糖是基因传递中很受关注的一类载体。这些多糖来源于天然或者半天然的材料，无毒性、可生物降解、具有良好的生物相容，并且容易修饰从而改善其物理化学性质。通过还原氨化反应，将不同的寡胺键合到氧化的多糖上，是制备阳离子多糖的方法。这些阳离子多糖已被广泛用于细胞与动物水平的基因传递研究。在所测试的超过 300 种的多糖-寡胺衍生物中，只有葡聚糖-精胺衍生物（D-SPM）在体内及体外均显示高转染效率。

## 引言

核酸传递在基础科学研究、生物技术、农业及医药领域均有广泛的应用。其主要应用之一是转染 DNA 或 RNA 用于基因治疗。基因治疗是一种治疗或预防与缺陷基因表达相关疾病的手段，这一手段将治疗基因导入细胞，表达基因并合成所需要的蛋白质。这种手段能够替代缺损的基因，或抑制不良基因的表达。经过近 20 年的研究，目前用于基因传递的载体主要有两类。其一是病毒载体，目前占主导地位，转染效率高，然而病毒载体的诱变性、免疫原性具有高风险，而且制备产率低，携带基因有尺寸限制。非病毒载体是一种可能克服病毒载体缺点的替代性载体。与病毒载体相比，非病毒载体的化学结构更明确，它主要包括阳离子聚合物或脂质材料，在水溶液中这些材料可以溶解或形成脂质体、胶束及类似结构。

聚阳离子载体是一类“自组装”的非病毒系统，它在水溶液中与带负电荷的核酸自

发形成复合物。在众多用于基因传递与转染的聚阳离子中，阳离子多糖极具吸引力。它们是天然材料，具有水溶性、生物可降解，同时具有良好的生物相容性、方便修饰以改善其物理化学性质。最常用的阳离子多糖包括壳聚糖及其衍生物，以及二乙基氨乙基葡聚糖（DEAE-dextran）。壳聚糖的毒性低，结构单元中的初级胺很容易进行季胺化修饰，或键合配体分子，也方便键合亲水性聚合物或溶内体多肽。

在最初的筛选实验中，我们合成了超过 300 种基于多糖-寡胺的转基因载体材料（Azzam et al. 2002b）。合成中的变量包括：不同的多糖（线性葡聚糖、普鲁兰多糖或支化阿拉伯半乳糖聚糖，分子质量及氧化程度各异），不同的寡胺（如 2～6 个氨基，以不同的摩尔比键合到糖单元），不同的反应条件（如 pH 与温度不同）。所有的聚合物均按如下的还原氨化方法合成：①用高碘酸钾（$KIO_4$）氧化多糖得到聚醛；②将寡胺以亚胺键接合到多糖上；③用硼氢化钠还原得到稳定的产物（图 1）。这些键合物随后用于细胞转染实验。

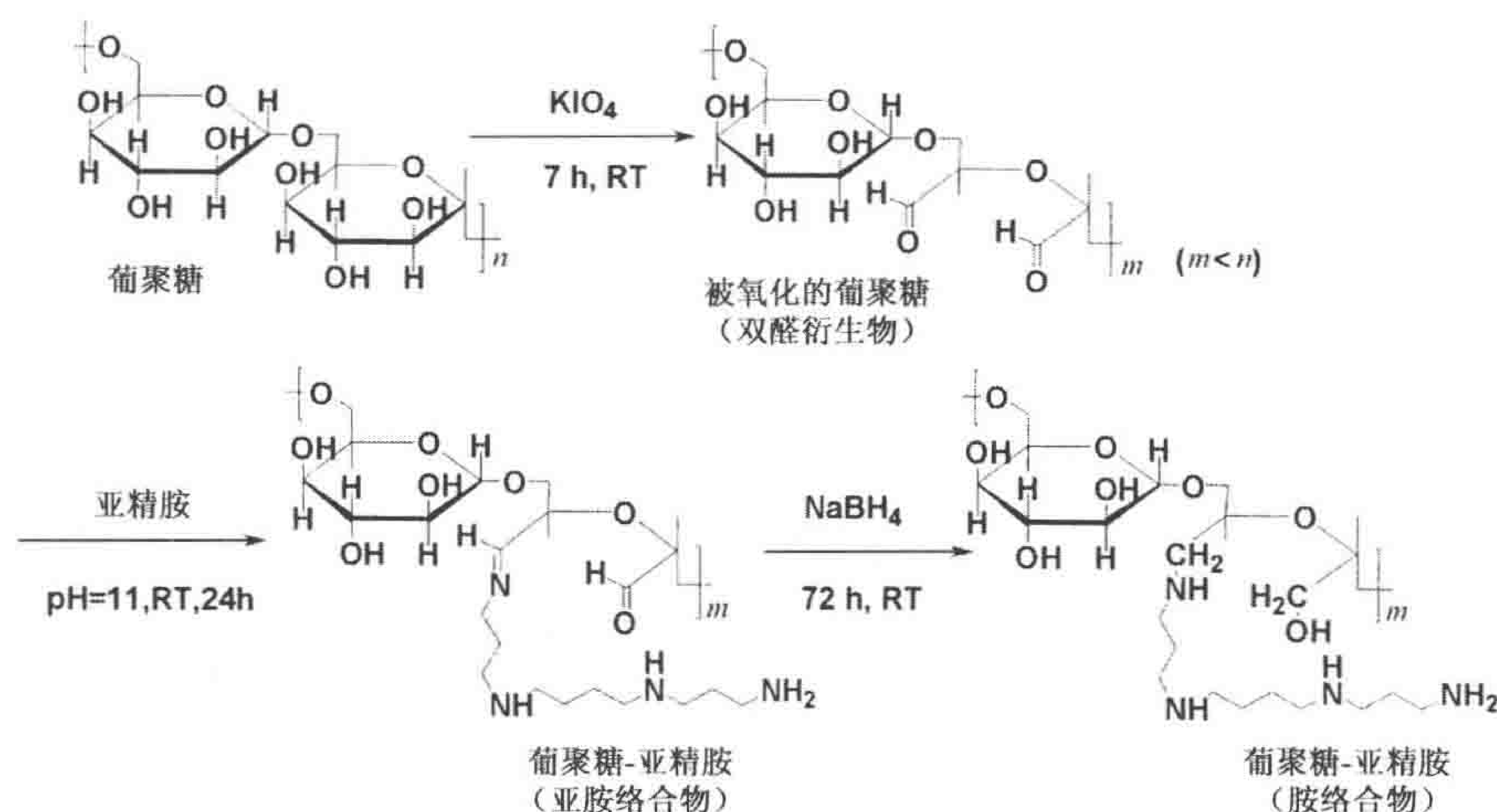



图 1. 接支精氨的葡聚糖。

意外的是，只有高度氧化的葡聚糖（如以 1∶1 的 $IO_4^-$/糖摩尔比氧化的葡聚糖）与精氨接合的水溶性 D-SPM 具有转染活性。D-SPM 在体外（Azzam et al. 2003）和体内（Hosseinkhani et al. 2004）转染均非常有效。通过肌肉注射和鼻腔吸入等方式，Eliyahu 等（2006a）证明 D-SPM 主要转染支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、支气管肺泡细胞，以及纤维细胞和肝实质细胞。D-SPM 与 DNA 的复合物经系统注射和局部给药均显示转基因能力（H. Eliyahu et al. 未发表），且具有良好的耐受性及低的毒性（Eliyahu et al. 2006a）。转染效率高度依赖于电荷比。对化学结构、物理参数和细胞转染的关系研究表明，交联的 SPM 以及含有大量未质子化二级胺的 D-SPM（其他所研究的阳离子多糖所不具备），对聚合物的转染效率至关重要。与 D-SPM 类似的是，线性聚乙烯亚胺（L-PEI）含有大量的二级胺，而支化的聚乙烯亚胺包含大量的二级胺和三次胺。这些二级胺和三级胺使聚合物在内含体中起到“质子海绵”的作用，促进它从内含体逃逸。D-SPM 的转染效率和 PEI 在无血清培养基中的转染效率相当，后者是检验非

病毒载体转染效率的重要标准（Eliyahu et al. 2005；H. Eliyahu et al. 未发表）

尽管聚醛与寡胺之间的还原氨化反应由于无规支化而难以重复，但是将反应溶液高度稀释或将聚醛逐步滴加到寡胺溶液中可以减少支化反应。聚阳离子上大量的初级胺可以进行化学修饰从而进一步调节其理化性质。这些修饰包括接支聚乙二醇（PEG）作为立体稳定剂（Hossinkhani et al. 2004）、部分疏水化处理（如接支油酸基团）（Azzam et al. 2004）、接支荧光分子进行示踪及机制研究、键合靶向基团和核定位肽（NLS）等。当在含血清的培养基中进行转染实验时，转染效率往往会明显降低。为了提高在血清存在时的转染效率，我们用 PEG 化的 D-SPM 衍生物在体内和体外进行转染实验。静脉或肌肉注射 PEG 化的 D-SPM 衍生物与 pSV-LacZ 的复合物比注射非 PEG 化的 D-SPM-pSV-LacZ 复合物在肝脏中具有更高的转染效率（表 1）（Hosseinkhani et al. 2004）。

**表 1. 静脉注射 5% PEG 化葡聚糖-精氨-pSV-LacZ 复合物及其他转染试剂 2d 后在不同器官的基因表达**

| 器官 | 特殊 β-半乳糖的活性(mU/mg 蛋白质) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | PBS[a] | PEGylated-D-SPM[b] | 自由质粒 DNA[c] | PEG 化葡聚糖-精氨-pSV-LacZ 复合物[d] |
| 血液 | 6.22±0.82[e] | 6.42±3.18 | 6.24±0.73 | 7.12±1.56 |
| 心脏 | 7.23±2.23 | 4.45±2.40 | 5.54±3.23 | 8.23±1.10 |
| 肺脏 | 6.94±3.12 | 8.25±0.75 | 9.02±0.52 | 7.29±0.14 |
| 肝脏 | 7.45±1.03 | 8.25±2.55 | 8.17±1.23 | 28.45±3.38 |
| 脾脏 | 5.87±1.14 | 4.45±3.46 | 7.30±1.05 | 9.13±1.45 |
| 肾脏 | 6.98±1.08 | 6.45±2.34 | 7.34±1.34 | 17.30±1.15 |
| 胃肠道 | 7.14±4.20 | 5.32±0.34 | 6.23±5.32 | 9.10±1.02 |
| 尸体 | 8.72±2.14 | 9.04±1.01 | 8.06±1.17 | 9.26±1.08 |
| 排泄物 | 7.94±0.15 | 8.16±0.23 | 6.24±3.90 | 5.45±3.34 |

a. 磷酸盐缓冲生理溶液作为对照（每次注射 200μl）。

b. PEG 化葡聚糖-精氨键合物（每只小鼠 250μg，溶于 200μl PBS 中）。

c. 质粒 DNA（每只小鼠 50μg，溶于 200μl PBS 中）。

d. 5% PEG 化葡聚糖-精氨-pSV-LacZ 复合物，聚阳离子/DNA 质量比为 5，每只小鼠注射 50μg 质粒，溶于 200μl PBS 中。

e. 平均值±标准值。

另外一种修饰方法是对 D-SPM 通过油酸化进行疏水处理（ODS）。水溶性的 D-SPM 与 DNA 的复合物在细胞培养中的转染效率依赖于血清浓度，并且随着血清含量的增大而降低，在含 50%血清的培养基中 95%的转染效率被抑制。相反的，ODS 与 DNA 的复合物在富含血清的培养基（50%血清）中转染效率却很高。在斑马鱼与小鼠中的实验结果表明 ODS 也可作为有效的体内转染的非病毒载体（Eliyahu et al. 2005）。

## 方案

### 阳离子多糖的合成及体外转染

以下描述阳离子多糖的合成和其用于 DNA 体外转染的方法。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

所有的溶剂均为分析纯级。

### 试剂

联辛可宁酸（BCA）试剂盒（Pierce）

β-gal ELISA 试剂盒（Roche）或 β-gal 检测试剂盒（Invitrogen）

磷酸钙试剂（Sigma-Aldrich）

待转染细胞，如

- C3H10T1/2
- HEK293
- CHO
- HeLa
- NIH3T3
- EPC
- COS-7

葡聚糖（平均分子质量 40kDa）（Sigma-Aldrich）

胎牛血清（FBS）（Beit Haemek，Israel）

谷氨酰胺（4nmol/L）（Beit Haemek，Israel）

HEPES-缓冲生理盐水（HBS；150mmol/L NaCl，20nmol/L HEPES，pH7.1）

　用 0.2μm 膜过滤除菌或高压灭菌于 4℃保存。

人生长激素（hGH）ELISA 试剂盒（Roche）

盐酸羟胺< !>

磷脂配方

- DOTAP/Chol 1/1（Avanti Polar Lipids Inc.，Alabama）
- Transfast（Promega）
- FuGENE 6（Roche）

萤光素酶报道基因检测试剂（Roche）或萤光素酶检测试剂盒（Promega）

培养基

- 完全培养基：DMEM，含 10%（*m*/*m*）胎牛血清（FBS）、0.2mmol/L L-谷氨酰胺、1mg/ml 青霉素，100U/ml 链霉素< !>
- DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）

氮气（储存复合物用）

青霉素（Beit Haemek，Israel）

质粒

　pEGFP-C1，CMV 启动子；pLNCluc 质粒，含萤火虫萤光素酶基因；pLacZ，SV40 或 CMV 启动子；pCMVhGH 用于定量及定性分析。使用 Nucleobond AX 500 柱（Machery-

Nagel, Duren, Germany）或 QIAGEN Plasmid Mega Kit（Hilden, Germany）纯化质粒。DNA 的浓度通过磷的含量确定，磷含量代表了 DNA 负电荷的量（Eliyahu et al. 2005）。

高碘酸钾（$KIO_4$）（Sigma-Aldrich）<!>

硼氢化钠（$NaBH_4$）（Sigma-Aldrich）<!>

精胺（Sigma-Aldrich）<!>

链霉素（Beit Haemek, Israel）<!>

仪器

纤维素透析管（截留分子质量 3500）

6 孔细胞培养板

Dowex-1（醋酸盐型）阳离子交换树脂

荧光显微镜（Model Axiovert 35, Zeiss, Jena, Germany）

冻干机

分光光度计，NMR（核磁共振波谱仪），红外

## 方法

## 阳离子多糖的合成：葡聚糖的氧化

1. 将葡聚糖（10g，62.5mmol 糖单元）溶于 200ml 二次去离子水中。
2. 以 1∶1 的摩尔比（糖单元/$IO_4^-$）加入高碘酸钾，室温下避光搅拌 6～8h。
3. 通过 Dowex-1 离子交换柱除去 $IO_3^-$ 及未反应的 $IO_4^-$，纯化聚醛。再用二次去离子水 4℃透析（纤维素透析管，截留分子质量 3500）3d。
4. 冻干纯化后的聚醛衍生物。产物为白色粉末。

   平均产率为 70%。FT-IR（KBr）在 $1724cm^{-1}$ 观察到 C=O 吸收峰。
5. 通过羟氨盐酸盐滴定测定聚醛含量（Zhao and Heindel 1991）。

寡胺键合

6. 将氧化后的葡聚糖（1g，0.75～6.56mmol 醛基）溶于 100ml 二次去离子水中。将其缓慢滴加到 50ml 含有 50%过量精胺的硼酸盐缓冲溶液中。
7. 室温下搅拌 24h。加入 $NaBH_4$（1g，4 倍醛基摩尔数），将亚胺还原成胺。继续搅拌 48h。
8. 另用 $NaBH_4$（1g，4 倍醛基摩尔数），反应 24h，重复还原。
9. 将亮黄色溶液转移到透析管中（纤维素透析管，截留分子质量 3500），用二次去离子水 4℃透析 3d。
10. 冻干透析产物，氮气条件下储存。平均产率为 50%（*m*/*m*）。通过对产物的核磁共振分析得到产物的氨基比例。（m）多重峰，（H）质子氢。

    $^1H$ NMR（$D_2O$）：

    1.645ppm（m，4H，葡聚糖-NH（$CH_2$）$_3$ $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$（$CH_2$）$_3$ $NH_2$）

    1.804ppm（m，4H，葡聚糖-$NHCH_2CH_2CH_2NH$（$CH_2$）$_4$ $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$）

2.815ppm（m，12H，葡聚糖-$NHCH_2CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_2NH_2$）

3.30～4.45ppm（m，葡萄糖质子氢）

5.01ppm（m，1H，异头碳质子氢）

FT-IR（KBr）

1468$cm^{-1}$（—$CH_2$—饱和烃），1653$cm^{-1}$（—$NH_2$，初级胺）

2935$cm^{-1}$（C—C，饱和烃）和3297$cm^{-1}$（—NH，—OH）

11. 通过TNBS方法测定初级胺的含量（Azzam et al. 2002a）。

体外转染（图2）

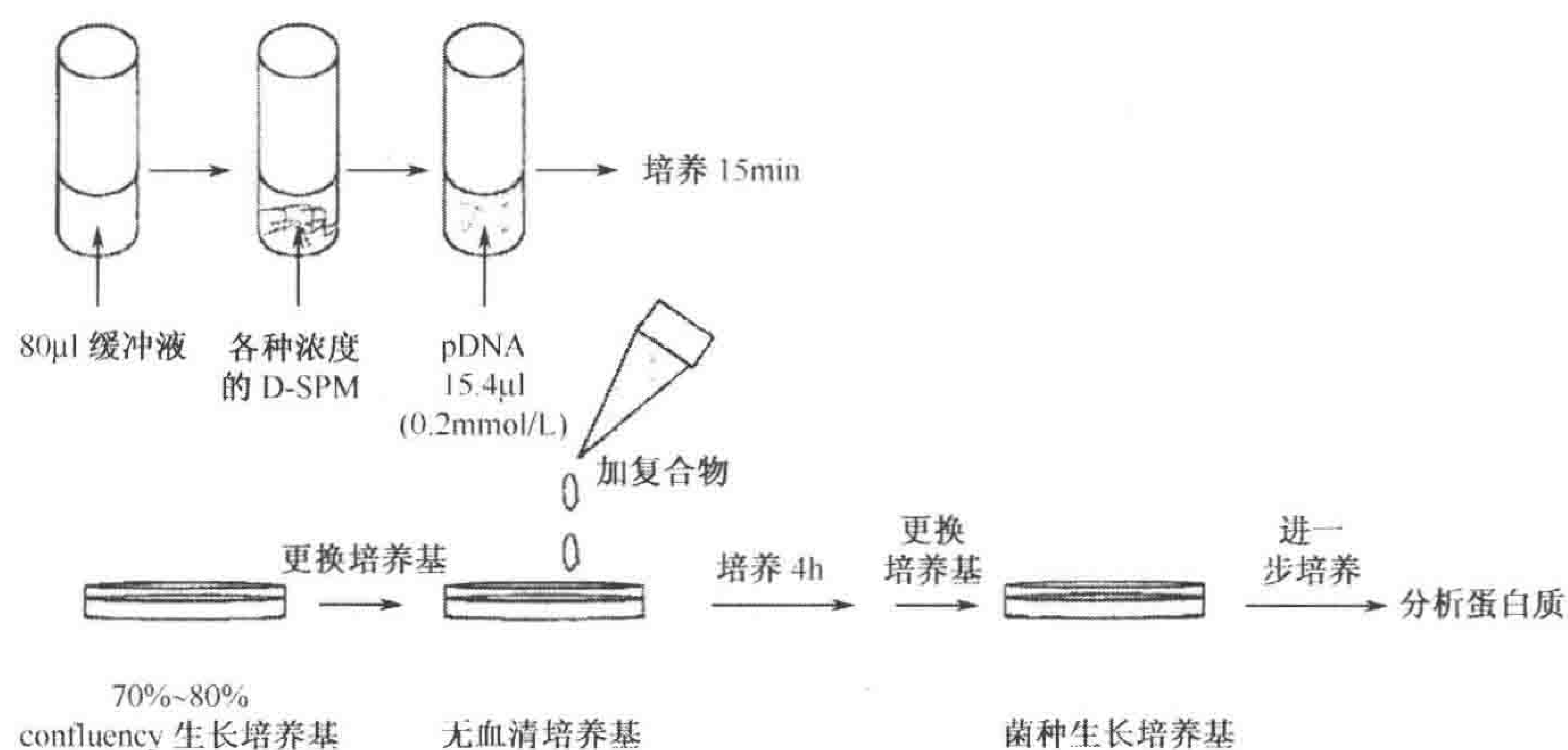



图2. 转染过程。

12. 转染前24h，用完全培养基将待转染的细胞以每孔$1.3\times10^5$接种在6孔板中，37℃，5% $CO_2$的条件下培养过夜。

    转染时细胞达到70%～80%的密度。

13. 用1ml DMEM培养基更换完全培养基。
14. 在每个转染实验中，用不同的聚合物/DNA比例（如2.5、5、7.5、10、12.5及15μg聚合物比1μg DNA）。用DMEM培养基或20nm HBS稀释聚阳离子/DNA复合物到终体积为200μl，室温静置15～30min。
15. 加入复合物polyplex或复合物lipoplex到培养板中。

    每次实验均设对照。按文献方法用磷酸钙试剂转染细胞（Wigler et al. 1978，1979）。按照操作手册使用DOTAP/Chol 1/1，Transfast及FuGENE 6。

16. 4h后，用1ml完全培养基代替DMEM。
17. 转染24h后用hGH ELISA试剂盒测定上清液中的hGH。
18. 转染48h后用β-gal ELISA试剂盒（Roche）或β-gal检测试剂盒测定细胞裂解液中的β-gal的活力。
19. 转染48h后用荧光素酶报道基因试剂或荧光素酶检测试剂盒定量荧光素酶的活力。
20. 转染48h后用荧光显微镜观察D-SPM-GFP转染的细胞数量。用视野内的绿色荧光

细胞数除以视野内的总细胞数计算转染效率（转染百分比）。

在有些情况下，基因表达可以用标准 BCA 试剂盒检测蛋白总量，对结果归一化。

## 致谢

AFIRST，French-Israeli Cooperation，the U．S．-Israeli BiNational Fund 及 Polygene 的资助。

## 参考文献

Azzam T., Eliyahu H., Makovitzki A., and Domb A.J. 2003. Dextran-spermine conjugate: An efficient vector for gene delivery. *Macromol. Symp.* **195:** 247–261.

Azzam T., Eliyahu H., Makovitzki A., Linial M., and Domb A.J. 2004. Hydrophobized dextran-spermine conjugate as potential vector for in vitro gene transfection. *J. Control. Release* **96:** 309–323.

Azzam T., Eliyahu H., Shapira L., Linial M., Barenholz Y., and Domb A.J. 2002a. Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery. *J. Med. Chem.* **45:** 1817–1824.

Azzam T., Raskin A., Makovitzki A., Brem H., Vierling P., Lineal M., and Domb A.J. 2002b. Cationic polysaccharides for gene delivery. *Macromolecules* **35:** 9947–9953.

Eliyahu H., Azzam T., Barenholz Y., and Domb A.J. 2006a. Dextran-spermine-based polyplexes—Evaluation of transgene expression and of local and systemic toxicity in mice. *Biomaterials* **27:** 1636–1645.

Eliyahu H., Siani S., Azzam T., Domb A.J., and Barenholz Y. 2006b. Relationships between chemical composition, physical properties and transfection efficiency of polysaccharide-spermine conjugates. *Biomaterials* **27:** 1646–1655.

Eliyahu H., Makovitzki A., Azzam T., Zlotkin A., Joseph A., Gazit D., Barenholz Y., and Domb A.J. 2005. Novel dextran-spermine conjugates as transfecting agents: Comparing water-soluble and micellar polymers. *Gene Ther.* **12:** 494–503.

Hosseinkhani H., Azzam T., Tabata Y., and Domb A.J. 2004. Dextran-spermine polycation: An efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection. *Gene Ther.* **11:** 194–203.

Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., and Axel R. 1978. Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* **14:** 725–731.

Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., Urlaub G., and Chasin L. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76:** 1373–1376.

Zhao H. and Heindel N.D. 1991. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharm. Res.* **8:** 400–402.

# 第五十章　用于持续释放编码血小板源生长因子和透明质酸合成酶 2 质粒 DNA 的交联透明质酸基质和薄膜

Weiliam Chen
Department of Biomedical Engineering, State University of New York, Stony Brook, New York 11794-2580

王均　译



## 摘要

天然多糖作为基因输送的载体正被广泛研究。透明质酸（HA）无炎症反应和无免疫原性的特点从临床应用角度讲显得尤为重要。此外，体内存在透明质酸酶，可促进透明质酸载体的降解。将 DNA 包载到交联的透明质酸材料中，在酶作用下可将透明质酸降解，从而释放携带 DNA 的 HA 片段。这些片段一方面是 DNA 的载体，另一方面又对 DNA 起到保护作用。基于未来的临床应用考量，本章介绍两种基于 HA（HA 基质和薄膜）的非水溶性 DNA 载体系统（Kim et al. 2003，2005）。其中，编码血小板源生长因子（PDGF）的 pDNA 与 HA 基质复合后（Kim et al. 2003），可以移植到慢性伤口并加速伤口愈合。同时，该体系也提供富含 HA 的环境，在伤口愈合中起重要作用（Bronson et al. 1987）。此外，编码透明质酸合成酶 2（HAS2）的 pDNA 与 HA 薄膜复合后（Kim et al. 2005），起初作为物理屏障，而后作为维持 HAS2 转染的 pDNA 库，从而使细胞不断合成 HA，可以用于阻止术后黏附。HA 载体系统的主要优点是其良好的生物相容性，另外，其降解几乎完全由透明质酸酶催化控制，降解形成的 DNA-HA 复合物既作为 DNA 的微载体，又能保护 DNA 分子的活性。这些载体最终将有机会在相关的临床应用中发挥作用。基于 HA 载体系统的主要缺陷在于它们在体内的转染效率不如预期的理想。

## 引言

HA 是具有良好生物相容性的天然高分子。它是一种具有高度保守性、生物相容性、生物可降解性的黏多糖，由 D-葡萄糖醛酸和 *N*-乙酰-D-葡萄糖胺交替连接而成（Toole 1990；Laurent and Fraser 1992；Goa and Benfield 1994）。除了可用于伤口修复外（Bronson et al. 1987），HA 还具有很好的润滑能力和防止术后粘连的功能。然而，天然 HA 水溶性极强，体内存留时间较短，限制了其在伤口敷化和阻止术后粘连上的应用。我们设计了交联的 HA 基质和薄膜，前者可以提供暂时的人工创面床，同时又可作为载体，控制释放编码 PDGF 的 pDNA，持续转染细胞并加速伤口愈合；后者先作为物理屏障，而后作为 pDNA 的储藏库，持续 HAS2 转染，持续合成 HA，延长阻止术后粘连的时间。

## 方案

### HA-DNA 基质和薄膜的制备

本方法描述 HA-DNA 基质和薄膜的制备，并验证它们的生物活性。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

己二酸二酰肼（ADH；Sigma-Aldrich）
Anti-Flag 抗体（Sigma-Aldrich），
COS-1 细胞（ATCC，Rockville，Maryland）
二甲基甲酰胺（Sigma-Aldrich）<!>
DMEM 培养基（Cellgro，Heindon，Virginia）
乙基-3-［3-二甲氨基］丙基 碳二亚胺（EDCI）（Sigma-Aldrich）<!>
胎牛血清（FBS）（Cellgro）
FGM-2 BulletKits 培养基（Roche Diagnostics）
HA 定量试剂盒（Corgenix，Westminster，Colorado）
Hoescht 33342 荧光染料（ex：485nm，em：530nm；Molecular Probes）<!>
HA（Kraeber GmbH & Co.，Waldhofstr，Germany）储存液（10mg/ml，i. e.，1%）
透明质酸酶（Sigma-Aldrich）
盐酸，1mol/L HCl <!>
异丙醇（80%、90%和 100%；Fischer Chemical）
MC 285 兔抗鼠 HAS2 多克隆抗体（来自 Dr. John McDonald，University of Utah）

和过氧化物酶标记的羊抗兔二抗

正常的新生人皮肤成纤维细胞（NNHDF；Clonetics）

磷酸盐缓冲液（PBS，Sigma-Aldrich）

质粒 DNA（pDNA，不同浓度），溶于无菌水

pFlag-CMV-5a 哺乳动物表达载体

这个载体有 cDNA 编码的 PDGF 或 HAS2 克隆位点。

PDGF 检测试剂盒 Quantikine ELISA Kit（R&D Systems）

### 仪器

铝质称重盘（灭菌，直径 4mm）（VWR Scientific）

细胞荧光计 Cytofluorometer（Cytofluor-II，Biosearch，Bedford，Massachusetts）

37℃培养箱（VWR Scientific）

冻干机（Freezemobile 12EL，Gardiner，New York）

振荡摇床（LabQuake shaker L-1237，Lab Industries，Berkeley，California）

## 方法

### HA-DNA 基质和薄膜的制备

1. 将 1ml 合适的 pDNA 溶液和 20ml 的 1%的 HA 溶液缓慢混合。
2. 将 8ml 上述 HA/pDNA 混合物转移到每个铝盘。然后按如下步骤操作。

**HA-DNA 基质**

a. 突然冷冻，并冻干 HA-DNA 混合物形成固体 HA-DNA 基质。

b. 将 100mg ADH 溶解在 90% DMF/10% $H_2O$ 的 100ml 混合溶液中。将上述固体 HA-DNA 基质与此 ADH 溶液培养 30min。

c. 将 120mg EDCI 溶解在上一步的混合物中，并用 1mol/L 的 HCl 调节 pH 至 5 启动交联反应。

d. 倒出溶液，倒入 100ml 90%的异丙醇，并反复用 90%异丙醇洗涤 HA-DNA 基质，最后用 100%异丙醇洗涤一次。

e. 将 HA-DNA 基质抽干。干燥好的材料如图 1A 所示（Kim et al. 2003）。

**HA-DNA 薄膜**

a. 风干 HA/pDNA 混合物形成 HA-DNA 薄膜。

b. 将 10mg ADH 溶解在 100ml 80%的异丙醇中，并将干燥的薄膜在此溶液中浸泡 30min，使之部分重新水化。

c. 加入 1ml EDCI 溶液（12mg/ml，溶于水中）到上述混合物中，用 1mol/L 的 HCl 调节 pH 至 5 启动交联反应。

d. 去除溶液，加入 100ml 90%异丙醇，并反复用 90%异丙醇洗涤薄膜，最后用 100%异丙醇洗涤一次。

e. 风干 HA-DNA 薄膜。干燥好的薄膜材料如图 1B 所示（Kim et al. 2003）。

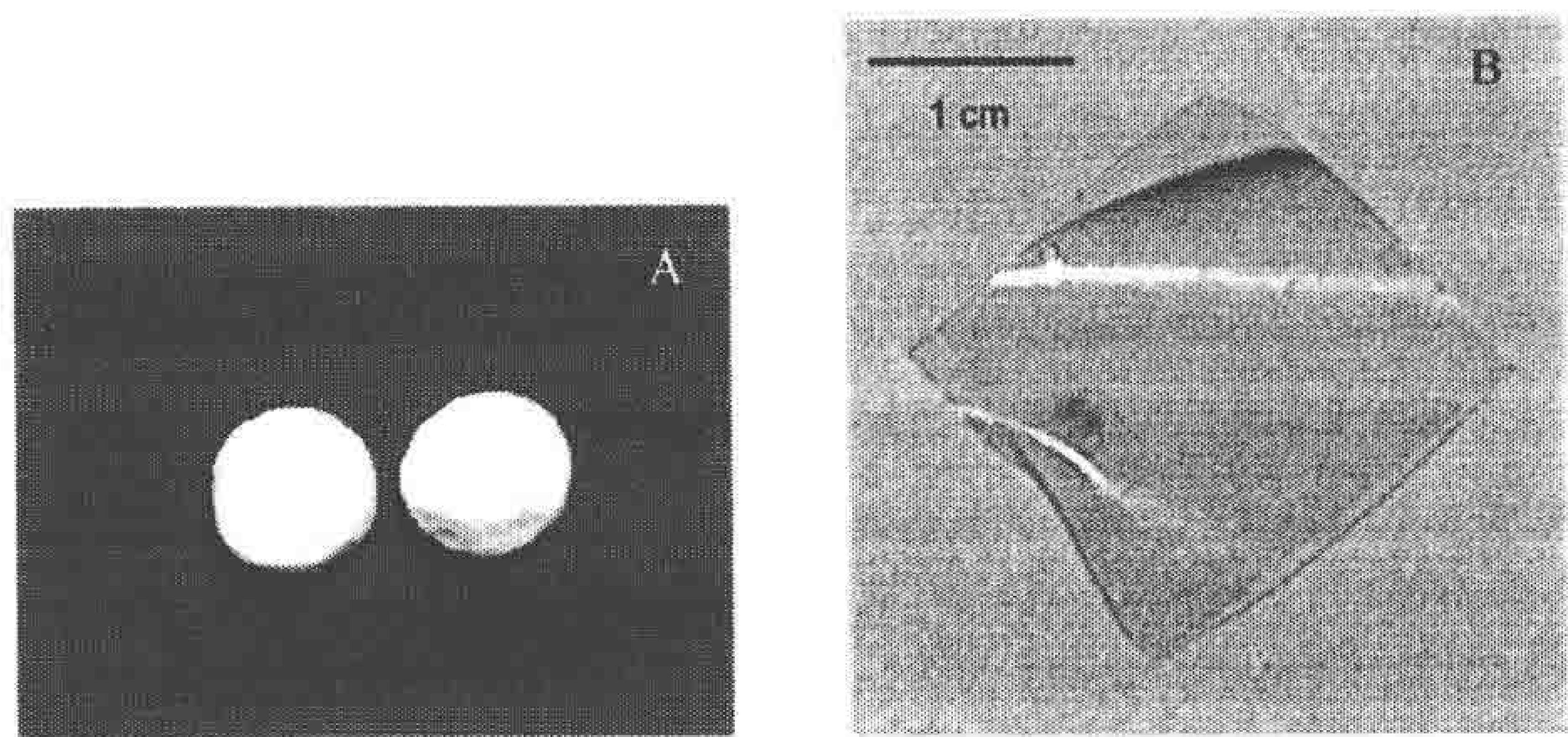



图 1. DNA-HA 基质（A）和 DNA-HA 薄膜（B）。（A. 引自 Kim et al. 2003；B. 引自 Kim et al. 2005 [© Elsevier]）

## 生物活性验证

3. 用 PBS 将透明质酸酶配成 10U/ml。用这种溶液消化基质和薄膜，在不同时间收集释放样品，并按如下步骤操作。

**HA-DNA 基质**

a. COS-1 细胞在 FGM-2 BulletKits 培养基（含 5% FBS，但不加生长补充物）中培养。按 FuGENE 介导的方法，用释放样品转染细胞（Kim et al. 2003）。

b. 孵育 3d 后收集培养基，并按 1∶2 的比例用 Modified FGM-2 BulletKits 培养基稀释。

c. 将稀释的培养基加入到生长密度为 $5\times10^4$ 个/$cm^2$ 的 NNHDF 细胞中。每天收获并冻存细胞，持续 5d。

d. 用 Hoescht 33342 染料和细胞荧光计评估细胞增殖的程度（Kim et al. 2003）。

e. 通过 Flag 免疫荧光染色确证 PDGF 外源性。结果如图 2 所示。

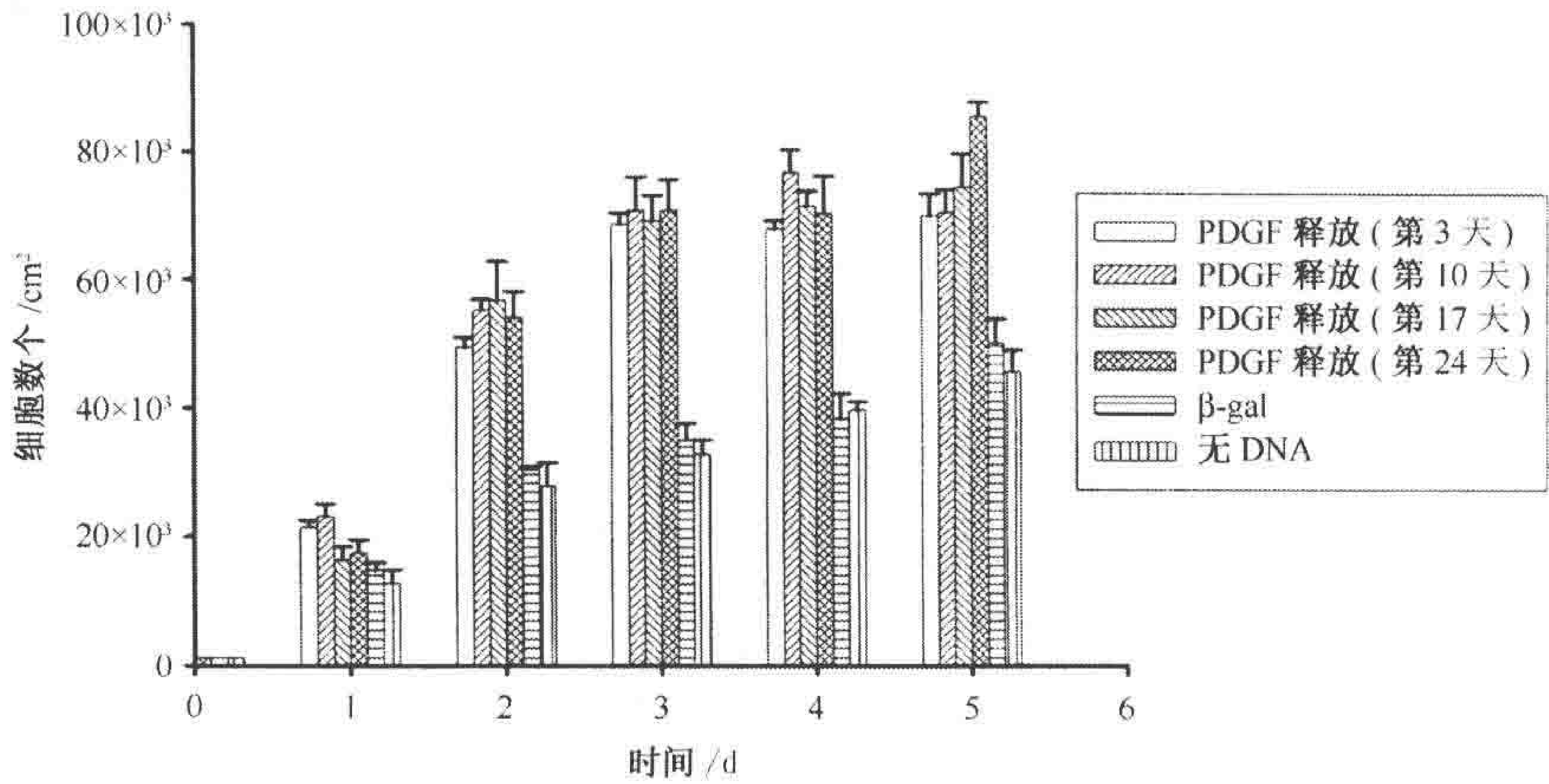



图 2. 细胞被 DNA-HA 基质释放物转染表达 PDGF，诱导人新生真皮成纤维细胞增殖。（引自 Kim et al. 2003 [© Elsevier]）

**HA-DNA 薄膜**

a. 用 DMEM 培养基培养 COS-1 细胞。按 FuGENE 介导的方法，用释放样品转染细胞（Kim et al. 2005）。

b. 使用 HA 定量试剂盒测定 HA 在培养基中的含量。表 1 给出部分实验结果作为事例（Kim et al. 2005）。

c. 用 MC285 兔抗 HAS2 抗体（结合使用过氧化物酶标记的羊抗兔二抗）检测 HAS2 的表达。

d. 通过 Flag 免疫荧光染色确证 HAS2 外源性（Kim et al. 2005）。

**表 1. 经 DNA-HA 薄膜释放物转染的细胞对 HA 的合成**

| DNA 释放样 1 | DNA 释放样 2 | 阳性对照 | 阴性对照 |
|---|---|---|---|
| 114.84ng/ml | 92.74ng/ml | 96.42ng/ml | 35.89ng/ml |

经允许引自 Kim 等(2005)。

## 致谢

这些研究由 NIH R34 AG17778 和 R34 HL66876 资助。

## 参 考 文 献

Bronson R.E., Bertolami C.N., and Siebert E.P. 1987. Modulation of fibroblast growth and glycosaminoglycan synthesis by interleukin-1. *Collagen Relat. Res.* **7:** 323–332.

Goa K.L. and Benfield P. 1994. Hyaluronic acid. A review of its pharmachology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* **47:** 536–566.

Kim A., Checkla D., Dehazya P., and Chen W. 2003. Characterization of hyaluronan-DNA matrices for sustained gene transfer. *J. Control. Release* **90:** 81–95.

Kim A., Yellen P., Yun Y.H., and Chen W. 2005. Delivery of a vector encoding mouse hyaluronan synthase 2 gene transfer via a crosslinked hyaluronan film. *Biomaterials* **26:** 1586–1593.

Laurent T.C. and Fraser J.R. 1992. Hyaluronan. *FASEB J.* **6:** 2397–2404.

Toole B.P. 1990. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2:** 839–844.

# 第五十一章　线性聚乙烯亚胺:合成及体外和体内转染操作

Manfred Ogris 和 Ernsy Wagner

Pharmaceutical Biology-Biotechnology, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität, D-81377 Munich, Germany

王均　译



## 摘要

线性聚乙烯亚胺(LPEI)是适合大量细胞系和原代细胞的非常有效的转染试剂,它同样也适用于体内局部或系统基因输送。与许多其他非病毒转染方法不同,LPEI 对有丝分裂的依赖性低,而且可以转染分裂后的细胞(Brunner et al. 2002)。用 LPEI 的转染过程操作简单,转染中血清的存在(不超过 10%)并不会明显降低转染的效率,但却显著降低毒性,特别是对于原代细胞的转染,这是 LPEI 相比于大部分脂质体转染系统的主要优点。经过优化后使用低剂量的 LPEI 也可以使毒性维持在最低水平。然而,无论是在体外还是体内,LPEI 用量一旦增加,毒性也会迅速增大。和大部分脂质体或基于聚合物的转染体系一样,LPEI 转染悬浮细胞的能力也较低。但是,如果 LPEI polyplex 含有如铁传递蛋白的细胞结合受体,转染悬浮细胞的效率就会大大增加(Kircheis et al. 2001)。LPEI 通过纯化学方法合成,前体相对便宜,易于进行大规模的细胞转染。

## 引言

LPEI 是一个在体内和体外最有效的转染试剂之一(Ferrari et al. 1997; Goula et al. 1998a, b)。当与核酸形成复合物时,LPEI 表现出一种不同于支化 PEI(BPEI)的生物物理行为,最初形成的小的 polyplex 在细胞表面聚集(Wightman et al. 2001)。在细胞质中,LPEI 比 BPEI 更容易释放 DNA(Itaka et al. 2004),加上 PEI 在内含体的质子缓冲作用(Sonawane et al. 2003),这些效应使 LPEI 具有高转染效率。在加入 polyplex 之后,用平转头在 280$g$ 离心 5min,可以进一步增加转染效率(Boussif et al. 1996)。

LPEI 与 DNA 形成复合物颗粒的大小依赖于所使用缓冲体系的盐含量，在无盐条件下，一般形成直径 50～100nm 的颗粒，而在 150mmol/L NaCl 溶液中，生成较大的团聚物(Goula et al. 1998b; Wightman et al. 2001)。在体外转染中，团聚的 polyplex 大颗粒经常表现出最好的转染结果，而在体内应用时，在葡萄糖溶液中制备尺寸较小的复合物颗粒，转染效率更高(Goula et al. 1998b; Wightman et al. 2001)。由于在体内或体外实验中，增加 LPEI 的剂量会显示增大的细胞毒性(Chollet et al. 2002; Boeckle et al. 2004)，因此通过滴定来寻找合适的 DNA 浓度非常必要。尽管 N/P 比在 4～10 都适合转染，但我们推荐使用 N/P 比为 6。如果仍然有明显的细胞毒性，可以进一步降低 N/P 比，或缩短 polyplex 与细胞的培养时间最低至 1h。LPEI 的合成应该在化学实验室完成，也可使用商品化的产品(PolyPlus, Illkirch, France [JetPEI], www.polyplus-transfection.com)。

## 方案

### 线性聚乙烯亚胺的合成及转染实验

实验方案描述从前体聚合物合成 LPEI，以及 DNA/LPEI polyplex 的制备；同时也给出了转染贴壁细胞或悬浮细胞的具体操作，以及体内实验的操作方法。

#### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

试剂

硫酸铜(分析纯)<!>

细胞培养基

HEPES-缓冲葡萄糖溶液(HBG; 5%葡萄糖 *m/V*，20mmol/L HEPES，pH 7.1)

　0.2μm 滤膜过滤，4℃保存

HEPES-缓冲生理盐水(HBS; 150mmol/L NaCl，20mmol/L HEPES，pH7.1)

　0.2μm 滤膜过滤，4℃保存

盐酸(30%，分析纯)<!>

小鼠，体内试验用

五氧化二磷<!>

质粒 DNA

聚合(2-乙基-2-噁唑啉)(50kDa; Sigma-Aldrich 37,284-6)

乙酸钠(分析纯)<!>

氢氧化钠(50% *m/V*，分析纯)<!>

硫酸(30%，分析纯)<!>

待转染细胞

## 仪器

烧杯
布氏漏斗
接点温度计
滤纸
0.2μm 滤器
冰浴
多孔板
油浴
pH 试纸
分液漏斗
回流冷凝管
注射器(1ml 胰岛素注射器，33 号针头)
UV 分光光度计
37℃水浴,用于体内实验

# 方法

## LPEI 的合成与纯化

本合成需采取适当的安全保护措施！LPEI 由酸催化水解聚 2-乙基-2- 唑啉而成。完全的脱丙酰作用对最终产物的转染性能非常关键(Thomas et al. 2005)。

1. 在 200ml 30％硫酸中溶解 45g 聚 2-乙基-2- 唑啉。
2. 加热反应混合物并搅拌 6d,通过共沸蒸馏除去生成的丙酸。
3. 通过滴加蒸馏水使混合物的总体积保持不变。
4. 106℃处理 5～6d 后,用 pH 试纸检测不到酸蒸气时,将溶液转移至烧杯中冰水浴冷却,边搅拌边加入 NaOH 中止反应。**注意:反应放热！**
5. 冷却溶液直到沉淀出现。较慢的沉淀过程有利于增加收率。
6. 在放置滤纸的布氏漏斗中过滤,用蒸馏水洗涤沉淀,直到洗涤水变成中性。
7. 用 $P_2O_5$ 干燥 LPEI 一周,室温保存。
8. 将 100mg LPEI 重悬于 1ml 蒸馏水中,滴加 HCl 调节 pH 至 7.1,用蒸馏水定容至 2ml。
9. 用 0.2μm 滤膜过滤 LPEI 溶液。过滤后用铜配合物法检测浓度。
10. 直接储存 50mg/ml LPEI 储存液或稀释至 1mg/ml,4℃保存。－80℃储存可延长使用期限。

## LPEI 的定量

Ungaro 等(2003)描述了用铜配合物法检测 LPEI 的方法。LPEI 和加入的 Cu II 离子形成深蓝色的铜氨复合物。

11. 配制 200ml 0.1mol/L pH5.4 的乙酸钠缓冲液。

12. 将 23mg $CuSO_4$ 溶解在 100ml 上述乙酸钠缓冲液中，搅拌至澄清，标计为 Cu(II)溶液。

13. 在 100μl 蒸馏水中配制含 1～10mg LPEI 的标准溶液，5 个浓度梯度，平行两份，用蒸馏水作空白。

14. 稀释不同量的待测 LPEI 溶液，总体积为 100μl。

15. 在上述样品中加入 100μl Cu(II)溶液，混合后常温放置 5min。

16. 使用 UV 分光光度计测量溶液在 285nm 的吸光值，用标准曲线计算 LPEI 浓度。

## 制备 polyplex

17. 制备 polyplex

计算 N/P 比：每个核苷酸平均分子质量为 330Da，含 1 个 P，LPEI 中平均 43Da 含一个 N。例如，用 1μg 的 DNA 制备 N/P 比为 6 的 polyplex，需要 LPEI 43×(6/330)＝0.78mg。1mg/ml 的 LPEI 溶液相当于 N 的浓度为 23.3mmol/L。

**体外转染**

a. 用 HBS 分别稀释 DNA(40μg/ml)和 LPEI(31μg/ml )，等体积，N/P＝6。

b. 转移 LPEI 溶液至 DNA 溶液中，用移液器快速上下混合 5～10 次。

c. 常温放置 20min 后用于转染实验。用含盐的缓冲溶液制备的 polyplex 随着放置时间的延长会出现团聚。

**体内转染**

a. 用 HBS 分别稀释 DNA( 400μg/ml)和 LPEI(310μg/ml )，等体积，N/P＝6。质粒和缓冲溶液均应不含内毒素。

b. 转移 LPEI 溶液至 DNA 溶液中，用移液器快速上下混合 10 次。

c. 常温放置 20min 用于注射。

## 转染

18. 转染操作

**贴壁细胞的转染**

a. 在转染前 1～2d，48 孔板中接种细胞。

细胞密度应为 50%～70%

b. 去除细胞培养基，代之以预热的新鲜培养基(100～200μl/$cm^2$ )。

c. 加入 polyplex(DNA 终浓度 0.5～5μg/ml)。用手轻微的涡旋后在细胞培养箱培养。

d. 4h 后，用新鲜培养液替换转染液。

**悬浮细胞的转染**

a. 离心对数生长期的细胞，用新鲜细胞培养液重悬，细胞密度为 $3\times10^5$ 个细胞/ml。

b. 48 孔板中每孔加 0.5ml 细胞悬液。加入 polyplex(含 DNA1～5μg)，用手轻微的涡旋后在细胞培养箱培养。

c. 加含有 1～5μg DNA 的 polyplex 溶液，轻轻的涡旋，然后放在细胞培养箱里。

d. 4h 后，280 $g$ 离心 5min，小心地去除约 400μl 的上清，补充 1ml 新鲜培养基。

在转染后 24～48h 观察到最佳转基因的表达，但取决于细胞系和所转染的基因。

**体内转染**

a. 固定小鼠，将尾巴浸在 37℃水浴 1min 扩张静脉。

b. 1ml 的注射器(33 号针头)吸取 polyplex 溶液，排出空气。在大概 5s 内静脉注射 polyplex 溶液(200～250ml)。

c. 注射 polyplex 到组织(如肿瘤)时，在注射的地方停留至少 1min 后拔出针头，防止液体漏出。

## 参考文献


Boeckle S., von Gersdorff K., van der Piepen S., Culmsee C., Wagner E., and Ogris M. 2004. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J. Gene Med.* **6:** 1102–1111.

Boussif O., Zanta M.A., and Behr J.P. 1996. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* **3:** 1074–1080.

Brunner S., Furtbauer E., Sauer T., Kursa M., and Wagner E. 2002. Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol. Ther.* **5:** 80–86.

Chollet P., Favrot M.C., Hurbin A., and Coll J.L. 2002. Side effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J. Gene Med.* **4:** 84–91.

Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J.P., Zacchello F., and Scarpa M. 1997. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* **4:** 1100–1106.

Goula D., Benoist D., Mantero S., Merlo G., Levi G., and Demeneix B.A. 1998a. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene. Ther.* **5:** 1291–1295.

Goula D., Remy J.S., Erbacher P., Wasowicz M., Levi G., Abdallah B., and Demeneix B.A. 1998b. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* **5:** 712–717.

Itaka K., Harada A., Yamasaki Y., Nakamura K., Kawaguchi H., and Kataoka K. 2004. In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J. Gene Med.* **6:** 76–84.

Kircheis R., Wightman L., Schreiber A., Robitza B., Rossler V., Kursa M., and Wagner E. 2001. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* **8:** 28–40.

Sonawane N.D., Szoka F.C., Jr., and Verkman A.S. 2003. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278:** 44826–44831.

Thomas M., Lu J.J., Ge Q., Zhang C., Chen J., and Klibanov A.M. 2005. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 5679–5684.

Ungaro F., De Rosa G., Miro A., and Quaglia F. 2003. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31:** 143–149.

Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicka R., Kursa M., and Wagner E. 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J. Gene Med.* **3:** 362–372.

# 第五十二章 用于基因传递的蛋白质纳米球：明胶纳米颗粒的制备和体外转染

Sushma Kommareddy 和 Mansoor M. Amiji
Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Northeastern University, Boston, Massachusetts 02115
王均和许严伟 译



## 摘要

纳米颗粒被广泛用于克服药物传递的屏障。与合成高分子相比，天然高分子纳米颗粒具有一些明显优势。本章描述用生物高分子明胶制备纳米粒的方法及相关的体外细胞培养实验，具体包括用乙醇去溶剂化制备纳米粒以及包载 DNA 时的注意事项。通过包裹一些电子密集性材料（如金纳米粒）并利用透射电子显微镜（TEM）进行观察可以示踪纳米颗粒在细胞内的行为。本章将介绍蛋白质纳米球包载金纳米颗粒的制备方法、细胞培养和 TEM 样品的制备。同时，也将介绍一些细胞培养技术，来定性和定量分析包载 DNA 纳米球的转染效果。

## 引言

胶体系统，包括纳米颗粒，可通过合适的释放过程将药物或基因输送到目标位点，这种

方式使药物输送系统的应用发生了革命性的改变。用于制备纳米颗粒的高分子材料包括合成材料和天然材料两种(Douglas et al. 1987; Speiser 1991;Goa and Benfield 1994; Mehvar 2000;Suh and Matthew 2000; Cascone et al. 2001; Djagny et al. 2001; Moghimi et al. 2001; Soppimath et al. 2001; Brigger et al. 2002; Chuang et al. 2002; Lavasanifar et al. 2002; Barratt 2003; Panyam and Labhasetwar 2003)。理想的高分子应具有生物相容性、生物可降解、毒性低、无菌和无热源,可以高容量的装载药物和基因,并防止其降解。

基于天然高分子的良好生物相容性和生物可降解性,与合成高分子相比,在药物和基因输送中更具优势。天然大分子如蛋白质和多糖为制备纳米尺度的颗粒提供了广泛的材料来源。白蛋白、明胶、玉米蛋白和聚氨基酸等蛋白质类分子是最为广泛运用的载体材料(Courts 1954; Flory and Weaver 1960; Goa and Benfield 1994; Farrugia and Groves 1999a,b; Djagny et al. 2001; Chuang et al. 2003; Kaul and Amiji 2002, 2004a,b, 2005; Lavasanifar et al. 2002; Kaul et al. 2003)。它们具有非抗原性、制备简单、易于通过氨基和羧基修饰,因而获得了广泛应用。随着生物技术的进一步发展,从明胶和其他蛋白质分子重复性制备具有特定物理化学性质的纳米颗粒成为可能。

明胶是一种非常常用的蛋白质,广泛应用于食品加工和药物制剂方面。明胶主要通过水解从牛和猪皮肤和骨头提取的 I 型胶原而制得(Counts 1954; Flory and Weaver 1960; Farrugia and Groves 1999b)。贯穿整个高分子链的大量侧链功能基团可以进行方便的修饰,引入新的功能。明胶的活性氨基可以用聚乙二醇(PEG)功能化,从而在纳米颗粒周围形成一层密集的亲水层,这样可以防止肝和肾中网状内皮系统(RES)对颗粒的俘获,提高颗粒在血液中的循环时间(Kaul and Amiji 2004a, 2005)。硫醇化明胶可以制备在血液循环中更稳定的纳米颗粒,而在高浓度谷胱甘肽存在的还原环境中释放药物(Kommareddy and Amiji 2005)。其他的修饰还包括明胶和共聚物的共价键合以及阳离子复合物(Leong et al. 1998; Kim and Byun 1999; Kaul and Amiji 2002, 2004a,b, 2005; Ma et al. 2002; Kaul et al. 2003; Kushibiki et al. 2004; Michaelis et al. 2004)。

用聚合物来制备纳米颗粒相对简单而且重复性高。然而,蛋白质分子质量的不均一性却是制备稳定纳米颗粒的重要难点。Marty 等(1978)首次观测到明胶的复合相行为受温度和其他实验条件的影响。为了发展制备明胶颗粒切实可行的方法,Farrugia 等研究了温度、pH 和乙醇浓度对明胶溶液分子质量分布的影响(Farrugia and Groves 1999b)。很多研究小组成功制备了明胶及其衍生物的纳米颗粒,并且进行了一系列生物医学应用的评价(Oppheneium 1986; Leo et al. 1997; Truong-Le et al. 1998; Cascone et al. 2002; Gupta et al. 2004; Vandervoort and Ludwig 2004)。

制备明胶纳米颗粒最常用的方法是去溶剂法,如用丙酮的两步去溶剂法或用亚硫酸钠凝聚法(Leong et al. 1998; Truong-Le et al. 1998, 1999; Coester et al. 2000; Brzoska et al. 2004; Michaelis et al. 2004)。去溶剂法中,不同极性的溶液加入到蛋白质溶液中时,蛋白质表面的水分子被替换下来,从而引起蛋白质分子的卷曲或者可控沉淀(Weber et al. 2000)。用乙醇去溶剂只是相对简单的一步过程。如图 1 所示,在明胶溶液进入凝聚区之前,明胶分子卷曲,紧接着是两相区和絮凝区 (Kreuter 1978; Marty et al. 1978)。乙醇去溶剂法最后可得到粒径为 100～200nm 的稳定的纳米颗粒,而粒径和产率受 pH 和搅拌条件的影响(Kreuter 1994; Farrugia and Groves 1999b)。纳米颗粒可以进一步用甲醛和戊二醛交联硬化,过

量的醛可用偏亚硫酸钠或一些简单的氨基酸(如甘氨酸)封闭除去。我们实验室规范化了去溶剂法制备明胶纳米颗粒及其功能化衍生物的操作步骤(Kaul and Amiji 2002; Kaul et al. 2003)。图 2 显示冷冻干燥的明胶纳米颗粒的扫描电镜照片。

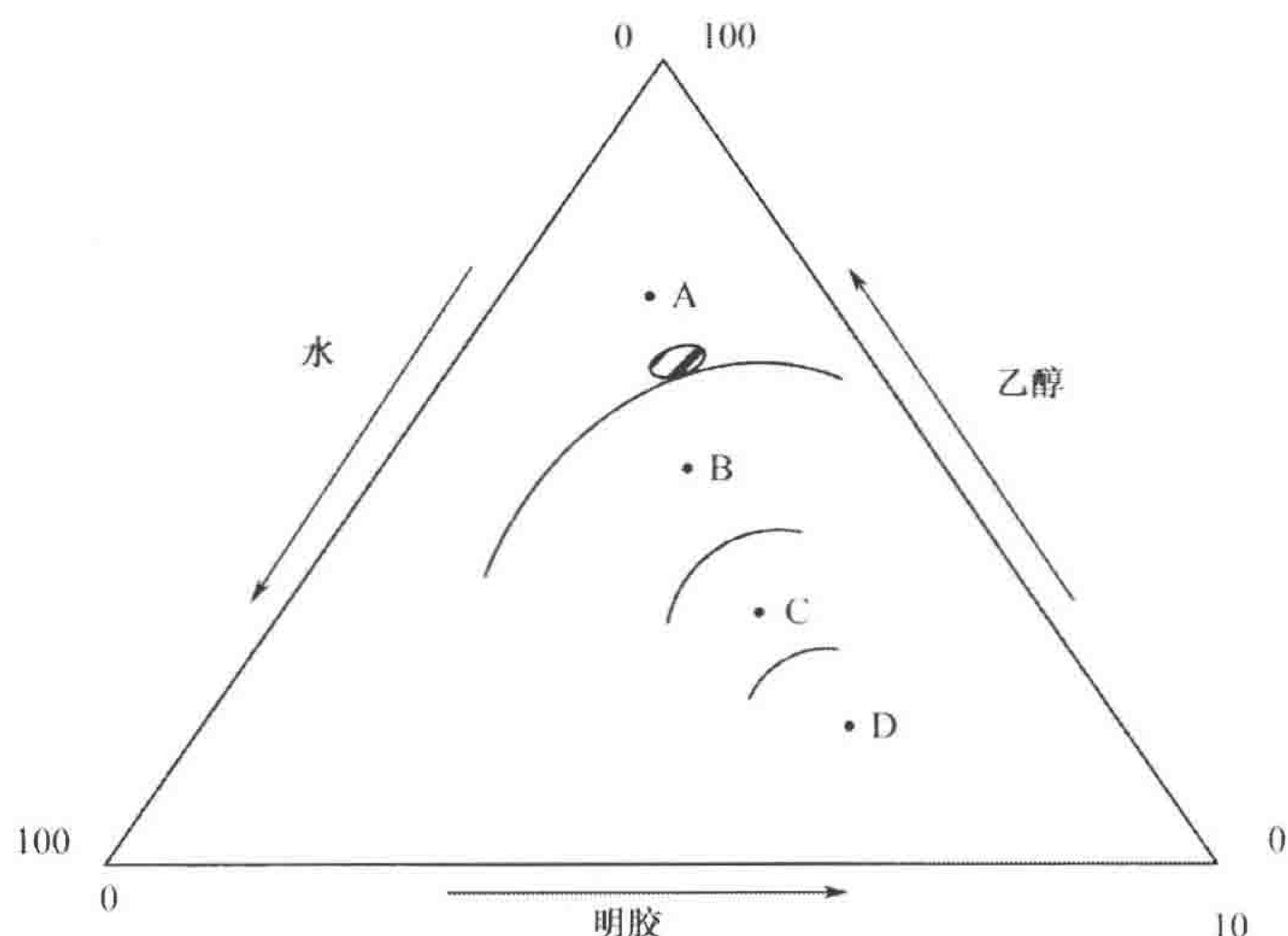



图 1.明胶 乙醇 水三组分体系制备明胶纳米颗粒的相图,乙醇 水组分比和乙醇 明胶组分比分别以% m/V 和% m/V 表示。A. 蛋白质分子卷曲区;B. 凝聚区;C. 两相区;D. 絮凝区。

按照颗粒制备方法,颗粒可分为纳米球(纳米颗粒)和纳米囊两种。纳米球是实心的,而纳米囊为空心的,内部填充目的化合物,外部环绕高分子外壳。明胶纳米颗粒通常用于包载质粒 DNA 或者其他亲水性的大分子(Leo et al. 1997, 1999; leong et al. 1998; Truong-Le et al. 1998, 1999; Coester et al. 2000; Kaul and Amiji 2002, 2004a,b, 2005; Kaul et al. 2003; Brzoska et al. 2004; Gupta et al. 2004; Zwiorek et al. 2004, 2005; Zillies and Coester 2005)。药物特别是质粒 DNA 也可以吸附到纳米颗粒的表面。

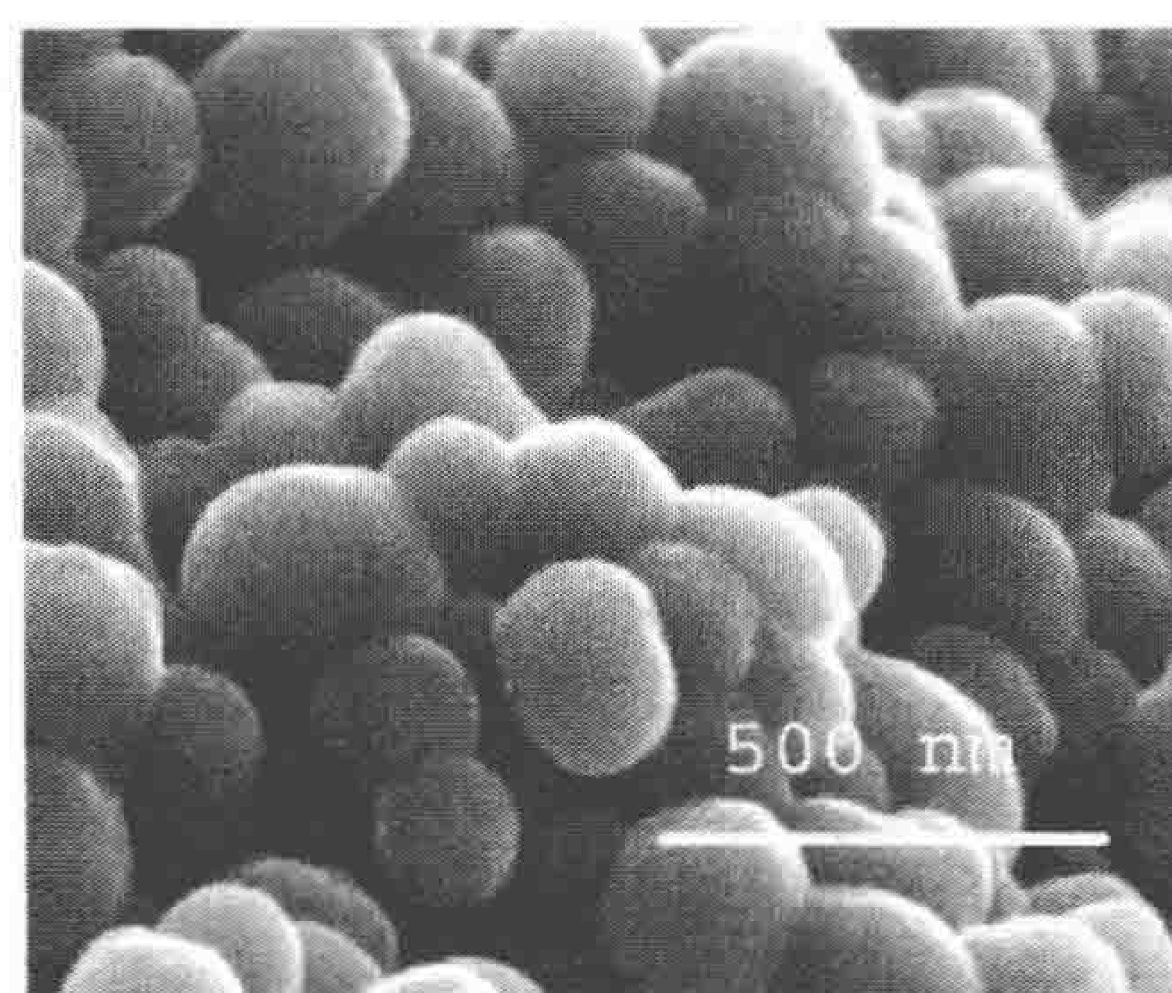



图 2.用去溶剂法制备的明胶纳米颗粒的扫描电镜图。

负载 DNA 的纳米颗粒被细胞吞噬后,经过内含体、溶酶体转运过程,最后到达细胞核附近区域,而基因转染的效率取决于基因在这一传输过程中稳定性的保持程度。对非病毒载体而言,基因传递的瓶颈在于质粒 DNA 难以穿越核膜。为了示踪明胶纳米颗粒在胞内传输 DNA 的过程,可以用荧光探针或金纳米颗粒作标记,后者的电子密度高,容易通过电镜观察,并具有复合蛋白质的能力(Kaul and Amiji 2004b)。如图 3 所示,细胞和明胶纳米颗粒在 Aclar 板上共培养,然后按 Frens 和 Horisberger 等介绍的方法通过电

镜观察被细胞吞噬的纳米颗粒在细胞内的位置(Frens 1973; Horisberger 1979)。

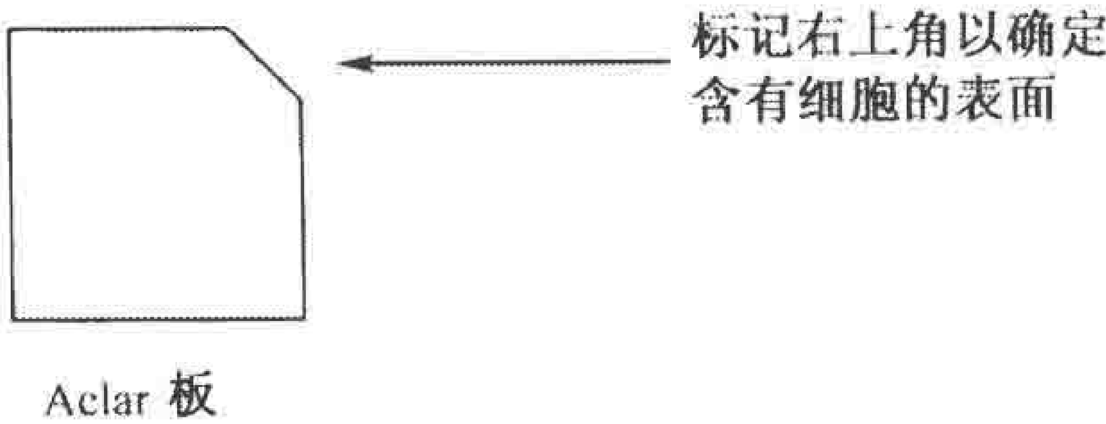



图 3.用于纳米颗粒在细胞内示踪的 Aclar 板的制备(标记右上角以确定含有细胞的表面)。

负载 DNA 的明胶纳米粒可用于基因转染和其他基因传递研究,结果可以由荧光显微镜定性观测,也可通过流式细胞计数(FACS)的方法定量测定。在内溶酶体的酸性环境和酶的共同作用下,纳米颗粒释放包载的质粒 DNA。图 4 显示了转染的相关机制。常用的转染试剂有磷酸钙、二乙基胺乙基葡聚糖(DEAE)和阳离子脂质体。Gorman 等(1982)发明了细菌氯霉素乙酰基转移酶(CAT)基因表达系统和 CAT 相关检测方法,从而提出了报道基因的概念。其他的报道基因还有萤光素酶、β-半乳糖苷酶、碱性磷酸盐和绿色荧光蛋白(GFP)。

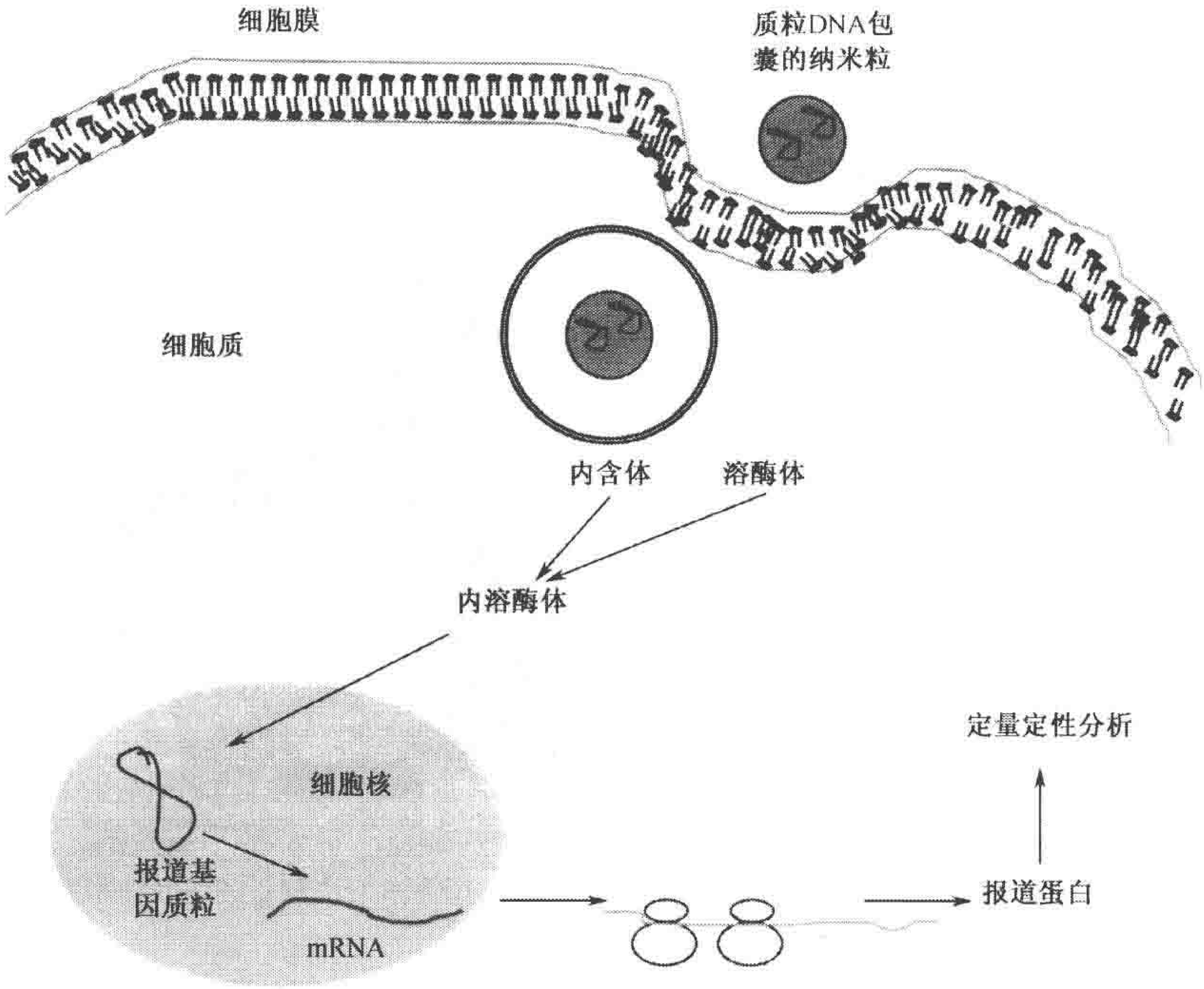



图 4.定性和定量分析纳米颗粒转染细胞的原理。

我们用明胶和 PEG 修饰的明胶纳米颗粒包裹金纳米颗粒,示踪明胶纳米颗粒在胞内的分布,发现纳米颗粒主要分布在核周区域。同时,我们用明胶和 PEG 修饰的明胶纳米颗粒包裹质粒 DNA,进行细胞转染实验,发现在最开始培养的 6h 内纳米颗粒就被 NIH-3T3 成纤维细胞内吞。在培养后 12h 就能观测到 GFP 表达,并且稳定表达超过 96h(Kaul and Amiji 2004b)。其他研究小组的研究结果也表明明胶纳米颗粒及其功能化衍

生物可用于体内体外的基因和药物传递(Leo et al. 1997, 1999; Leong et al. 1998; Truong-Le et al. 1998, 1999; Kaul and Amiji 2002, 2004a, b, 2005; Kaul et al. 2003; Zwiorek et al. 2004, 2005; Zillies and Coester 2005)。

## 方案 1

# 明胶纳米颗粒的制备和 DNA 装载

以下描述明胶及其衍生物纳米颗粒的制备,以及装载 DNA 和评估装载率的方法。

## 材料

**注意**:标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

乙醇(200 proof)

明胶(B 型,Bloom strength 225)

甘氨酸(0.1mol/L)<!>

醛(40% 戊二醛)<!>

磷酸盐缓冲液(PBS)

> 配置 1L 的 PBS,在 900ml 的水中溶解 8g 氯化钠、0.2g 氯化钾<!>、1.44g 磷酸氢二钠<!>和 0.24g 磷酸二氢钾<!>,调节 pH 为 7.4,最后将溶液总体积定容为 1L。

PicoGreen <!>或其他结合 DNA 的荧光染料

蛋白酶

氢氧化钠<!>(NaOH 0.1mol/L)

### 仪器

冷冻干燥机

超速离心机

37℃水浴

## 方法

### 明胶纳米颗粒的制备

1. 将 200mg 明胶溶于 20ml 水中,37℃水浴中溶解,制备 1% (*m*/*V*)明胶溶液。
2. 用 0.1mol/L NaOH 溶液调解明胶溶液的 pH 为 7.0。如要装载 DNA,跳到步骤 9。
3. 在剧烈搅拌下加入约 65ml 乙醇,直至溶液浑浊。

   为了获得较高的产率,应使温度和 pH 保持恒定。溶液浑浊但没有肉眼可见的颗粒表明纳米颗粒的形成。
4. 将 0.1ml 的 40%(*m*/*V*)戊二醛溶液稀释至 1ml,持续搅拌下,在 10min 内缓慢滴加到

纳米颗粒中。这将使单个纳米颗粒交联，而避免两个以上纳米颗粒之间交联或聚集。

5. 加入 10ml 0.1mol/L 甘氨酸封闭过量的醛基。

### 分离和纯化

6. 超速离心分离收集纳米颗粒(16 000r/min，30min)。
7. 将沉积物重悬在水中，重复离心，以除去微量的乙醇和未反应的甘氨酸。
8. 反复清洗后，将纳米颗粒沉积物重悬在 1ml 或 2ml 水中冻干。

### 明胶纳米颗粒负载 DNA

9. 明胶纳米颗粒负载 DNA。

   **包载 DNA**

   a. 在待制备纳米颗粒的明胶溶液中溶解质粒 DNA，DNA 浓度为 0.1%(*m*/*m*)～1%(*m*/*m*)。

   为了避免沉积现象，在调节 pH 之后加入 DNA，这样可以确保 DNA 是物理包裹在纳米明胶颗粒内的，而不是通过静电作用形成复合物或简单吸附在纳米颗粒表面。

   b. 参照步骤 3～8 纯化包载 DNA 的明胶纳米颗粒。

   **制备表面吸附 DNA 的纳米颗粒**

   a. 制备空白的明胶纳米颗粒溶液，然后和药物/DNA 溶液培养。调解悬浮液 pH，以使明胶纳米颗粒的表面带正电荷。

   b. 同上分离纳米颗粒以除去残余的 DNA。

### 包载或表面吸附 DNA 量的确定

10. 用合适的方法绘制 DNA 溶液的标准曲线，使用 PicoGreen 或其他能结合双链 DNA 的荧光染料。
11. 离心分离负载 DNA 的纳米颗粒。
12. 反复清洗除去纳米颗粒表面吸附的 DNA。
13. 收集上清液和清洗液，测量 DNA 的浓度。
14. 用初始加入 DNA 总量减去上清液和清洗液中 DNA 的量，按下式计算装载效率。

$$装载效率(\%)=\frac{包裹量}{总量}\times 100$$

15. 也可直接将负载 DNA 的明胶纳米颗粒用 0.2mg/ml 蛋白酶的 PBS(pH 7.4)溶液培养 30min 使纳米颗粒完全降解，生成澄清的溶液，然后用 PicoGreen 或相似染料直接测量 DNA 的负载量。

**方案 2**

## 细胞内示踪研究

以下描述金纳米颗粒的制备，包覆金纳米颗粒到蛋白质纳米粒的方法、培养条件，以及 TEM 样品的制备。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

待金纳米颗粒处理的细胞
蒸馏去离子水（$ddH_2O$）
乙醇（200 proof）（30%、50%、75%、85%、90%和100%）
明胶（B型，Bloom strength 225）
戊二醛（2.5%，溶于0.1mol/L甲次砷酸钠缓冲溶液）<!>
甘氨酸（0.1mol/L）<!>
醛（40%戊二醛）<!>
氯化金（4.34% *m/V*）<!>
培养基：细胞生长培养基和无血清培养基
四氧化锇（1% *m/V*，溶于0.1mol/L甲次砷酸钠缓冲溶液）<!>
甲次砷酸钠缓冲溶液（0.1mol/L）<!>
氢氧化钠（0.1mol/L）<!>
Spurr树脂<!>
柠檬酸钠（1% *m/V*，新鲜配制）<!>

### 仪器

Aclar板
铝片
37℃细胞培养箱
冷冻干燥机
60℃烘箱
回流冷凝管
250ml圆底烧瓶
6孔组织培养板
透射电子显微镜
超速离心机
超薄切片机
37℃水浴

## 方法

### 金纳米颗粒的制备

1. 在连接回流冷凝装置的250ml圆底烧瓶中加入99ml $ddH_2O$。

2. 加入 230μl 4.34%(*m*/*V*)氯化金溶液,搅拌,加热到回流。
3. 加入大约 2.5ml 新鲜配制的 1%(*m*/*V*)柠檬酸钠溶液。
4. 加热 10min,溶液的颜色由灰色变为黑紫色,葡萄酒色,最后深红色。
5. 继续加热 2～3min,直到溶液呈稳定的橘红色。
6. 冷却反应液至室温,4℃保存。
7. 32 000r/min 离心分离金纳米颗粒。颗粒的粒径范围为 10～15nm。

### 蛋白质纳米球包裹金纳米颗粒

8. 将 200mg 明胶溶解在 20ml 水中,配制 1%(*m*/*V*)明胶溶液,在 37℃水浴下溶解。
9. 将上述制备的金纳米颗粒和明胶溶液在 37℃下混合。
10. 用 0.1mol/L NaOH 调节溶液 pH 至 7.0。接着,然后按方案 1 步骤 3～5 制备明胶纳米颗粒。为了制备包裹金纳米颗粒的明胶颗粒,按方案 1 描述的方法将它们分散在明胶溶液中。
11. 离心分离包裹金的明胶纳米颗粒,按方案 1 步骤 6～8 冻干。

### 细胞培养

12. 把 Aclar 板剪成方形,尺寸和 6 孔板匹配。

    减去其中一个小角,用于区分细胞生长面(图 3)。
13. 加入合适的培养基,在 Aclar 板种植细胞, 37℃培养到 50%的细胞密度。细胞接种密度可以为 $1\times10^6$ 个每孔;根据细胞生长的快慢,培养 24～48h。
14. 将包裹金纳米颗粒的明胶纳米粒重悬于无血清的培养基,37℃和细胞一起培养。

    为了确定细胞对纳米颗粒的吞噬时间,可调节培养时间为 1～6h,不同时间点取样,用电镜观测。
15. 除去纳米颗粒悬浮液,加入培养基。
16. 分时间点制样,按照下面操作制备电镜样品。

### 电镜样品的制备

17. 取出样品浸入 2ml 2.5%(*m*/*V*)的戊二醛中 1h(戊二醛溶于 0.1mol/L 甲次砷酸钠缓冲溶液)。
18. 用 0.1mol/L 甲次砷酸钠缓冲溶液 4℃下清洗样品 3 次,每次 10min。
19. 用 1%(*m*/*V*) 四氧化锇(溶于 0.1mol/L 二甲砷酸盐缓冲溶液)室温下固定细胞 1h,然后用 0.1mol/L 甲次砷酸钠缓冲溶液清洗 3 次,每次 10min。
20. 用不同浓度的乙醇依次浸泡细胞,进行脱水处理,乙醇浓度依次为 30%、50%、75%、85%和 95%,每次浸泡 10min。
21. 室温下用 100%乙醇脱水处理 1h。
22. 用 1∶1 乙醇和 Spurr 树脂浸润细胞 1.5h,接着用 100% Spurr 树脂包埋 2h。
23. 将带有脱水和树脂包埋细胞的 Aclar 板置于覆盖 Spurr 树脂的铝片的底部,60℃烘箱中加热聚合 24h。
24. 超薄切片 Spurr 树脂中的样品。

25. 用四氧化锇对切片染色，电镜下观测。

TEM 样品制备的步骤总结于表 1。

**表 1. TEM 样品制备总结**

| 过程 | 化学处理 | 温度 | 时间 |
|---|---|---|---|
| 初次固定 | Aclar 板表面的细胞经含 2.5%戊二醛的 0.1mol/L 碳酸钠缓冲溶液固定 | 室温 | 1h |
| 洗涤 | 0.1mol/L 碳酸钠缓冲溶液，3 次 | 4℃ | 10min |
| 第二次固定 | 1%(*m*/*V*)四氧化锇 | 室温 | 1h |
| 洗涤 | 0.1mol/L 碳酸钠缓冲溶液，3 次 | 4℃ | 10min |
| 脱水 | 30%乙醇 | 4℃ | 10min |
| | 50%乙醇 | 室温 | 10min |
| | 75%乙醇 | | 10min |
| | 85%乙醇 | | 10min |
| | 95%乙醇 | | 10min |
| | 无水乙醇 | | 1h |
| 树脂处理 | 1∶1 乙醇和 Spurr 树脂 | 室温 | 1.5h |
| 包埋 | 100%Spurr 树脂 | 室温 | 2h |
| 固化 | Aclar 板置于覆盖 Spurr 树脂的铝片的底部 | 60℃ | 24h |

## 方案 3

# 细胞转染和分析

以下描述用负载 DNA 的明胶纳米颗粒转染细胞的过程，以及用荧光显微镜和 FACS 进行定性和定量分析的方法。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

待转染细胞

异丙醇（70%）＜!＞

培养基：合适的细胞生长培养基和无血清培养基

Mounting medium（biomeda）

磷酸盐缓冲生理盐水（PBS；无菌）

报道质粒 DNA（如 EGFP-1、CMV-β）

台盼蓝＜!＞

1×胰蛋白酶-EDTA（0.05%胰蛋白酶，0.53mmol/L EDTA 溶液）

### 仪器

流式细胞仪（FACS）

荧光显微镜（如 Olympus BX61）

用于荧光显微镜观察的盖玻片

载玻片

37℃细胞培养箱（5% $CO_2$）

细胞计数板

6 孔组织培养板

## 方法

### 细胞转染

1. 把盖玻片在 70%乙醇中浸泡几分钟。用镊子镊取盖玻片在酒精灯火焰上穿过消毒。
2. 把消毒盖玻片放在 6 孔培养板的底部。
3. 用 1×胰蛋白酶-EDTA 消化细胞。
4. 离心分离细胞，在新培养基中重悬。
5. 在大约 50μl 细胞液加入 200μl 台盼蓝，对死细胞染色，并对活细胞计数。
6. 在置有盖玻片的 6 孔板每孔种植 $10^5$ 个细胞。
7. 37℃，5% $CO_2$ 气氛培养细胞至 50%细胞密度。
8. 将负载 DNA 或荧光标记的明胶纳米颗粒分散在无血清的培养基中，并加入到细胞中，确保每孔中纳米颗粒含 20μg DNA。
9. 将细胞培养 6h，吸除含有纳米颗粒的培养液，用无菌 PBS 洗涤，换上新鲜培养基。

### 细胞转染分析

10. 按如下方法分析细胞转染效率

**荧光显微镜观察**

a. 在转染的不同时刻（至少培养 6h，才能观察到报道基因的表达），吸除培养基，用无菌 PBS 清洗 3 次。

b. 将盖玻片固定到干净的载玻片上，使用不含荧光杂质的固定液。

c. 用荧光显微镜观测细胞对纳米颗粒的吞噬和细胞内纳米颗粒的分布。

图 5 所示含无菌盖玻片的 6 孔板。载有 EGFP-N1 质粒 DNA 的纳米粒子转染 NIH-3T3 细胞的荧光照片如图 6（见彩版）所示。

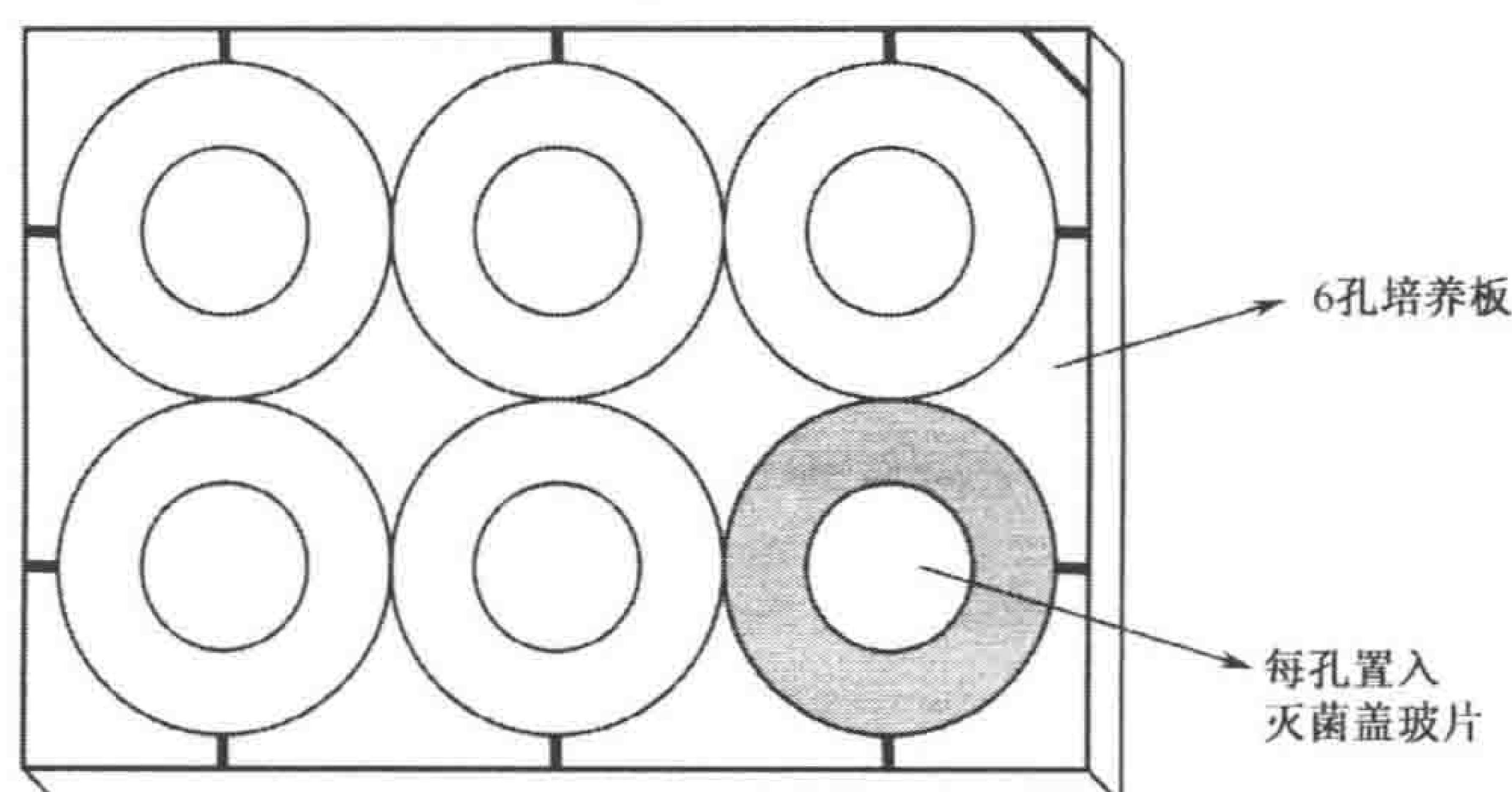



图 5. 用于荧光显微研究的 6 孔培养板，含无菌盖玻片。在 6 孔板中的每孔放置无菌的盖玻片。

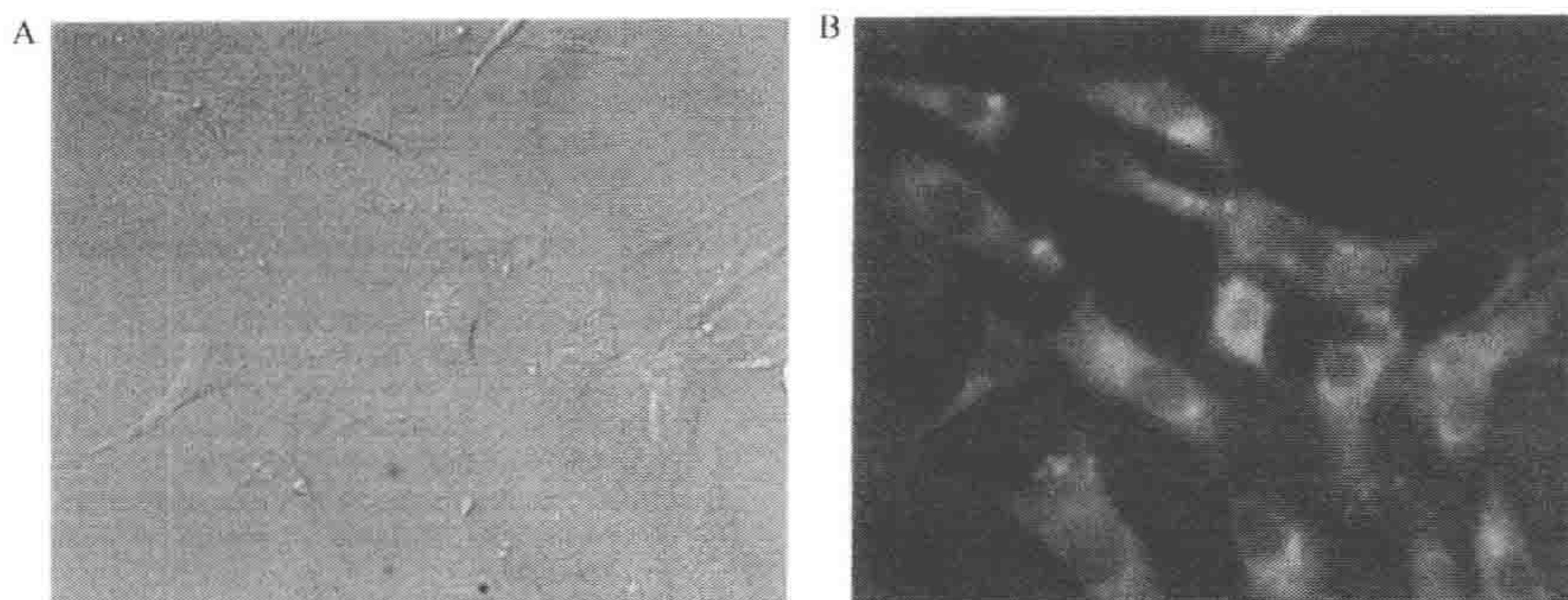



图 6．明胶纳米粒子包载 pEGFPN 1 质粒 DNA，并转染 NIH-3T3 细胞 24h 后，用 OlympusBX61 观察的微分干涉显微照片（A）和荧光显微照片（B）。

## FACS 分析

按步骤 3～9 培养并转染细胞，使用不含盖玻片的 6 孔板，按如下方法操作：

a. 培养足够时间以使细胞合成质粒 DNA 编码的蛋白质。

b. 按照使用质粒 DNA 的类型，定量分析转染效率。如使用 EGFP 报道基因，可用 FACS 分析 GFP 蛋白的表达。如果是萤光素酶，测量化学荧光，而 β-半乳糖苷酶的表达则可用染色法观察。

## 参考文献


Barratt G. 2003. Colloidal drug carriers: Achievements and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **60:** 21–37.

Brigger I., Dubernet C., and Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Delivery Rev.* **54:** 631–651.

Brzoska M., Langer K., Coester C., Loitsch S., Wagner T.O., and Mallinckrodt C. 2004. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells—In vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318:** 562–570.

Cascone M.G., Lazzeri L., Carmignani C., and Zhu Z. 2002. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13:** 523–526.

Cascone M.G., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G., and Lazzeri L. 2001. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12:** 267–281.

Chuang V.T., Kragh-Hansen U., and Otagiri M. 2002. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm. Res.* **19:** 569–577.

Coester C.J., Langer K., van Briesen H., and Kreuter J. 2000. Gelatin nanoparticles by two step desolvation—A new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsul.* **17:** 187–193.

Courts A. 1954. The N-terminal amino acid residues of gelatin 2. Thermal degradation. *Biochem. J.* **58:** 74–79.

Djagny V.B., Wang Z., and Xu S. 2001. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41:** 481–492.

Douglas S.J., Davis S.S., and Illum L. 1987. Nanoparticles in drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **3:** 233–261.

Farrugia C.A. and Groves M.J. 1999a. The activity of unloaded gelatin nanoparticles on murine melanoma B16-F0 growth in vivo. *Anticancer Res.* **19:** 1027–1031.

———. 1999b. Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: Designing a nanoparticulate formulation. *J. Pharm. Pharmacol.* **51:** 643–649.

Flory P.J. and Weaver E.S. 1960. Helix–coil transitions in dilute aqueous collagen solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **82:** 4518–4525.

Frens G. 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. *Nat. Phys. Sci.* **241:** 20–22.

Goa K.L. and Benfield P. 1994. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* **47:** 536–566.

Gorman C.M., Moffat L.F., and Howard H.F. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2:** 1044–1051.

Gupta A.K., Gupta M., Yarwood S.J., and Curtis A.S. 2004. Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. *J. Control. Release* **95:** 197–207.

Horisberger M. 1979. Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. *Biol. Cell* **36:** 253–258.

Kaul G. and Amiji M. 2002. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm. Res.* **19:** 1062–1068.

———. 2004a. Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model. *J. Drug Target.* **12:** 585–591.

———. 2004b. Cellular interactions and in vitro DNA transfection studies with poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **94:** 184–198.

———. 2005. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: In vitro and in vivo studies. *Pharm. Res.* **22:** 951–961.

Kaul G., Lee-Parsons C., and Amiji M. 2003. Poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm. Eng.* **23:** 1–5.

Kim K.J. and Byun Y. 1999. Preparation and characterizations of self-assembled PEGylated gelatin nanoparticles. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4:** 210–214.

Kommareddy S. and Amiji M. 2005. Preparation and evaluation of thiol-modified gelatin nanoparticles for intracellular DNA delivery in response to glutathione. *Bioconjug. Chem.* **16:** 1423–1432.

Kreuter J. 1978. Nanoparticles and nanocapsules: New dosage forms in the nanometer size range. *Pharm. Acta Helv.* **53:** 33–39.

———. 1994. Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **19:** 253–256.

Kushibiki T., Matsuoka H., and Tabata Y. 2004. Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates. *Biomacromolecules* **5:** 202–208.

Lavasanifar A., Samuel J., and Kwon G.S. 2002. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **54:** 169–190.

Leo E., Cameroni R., and Forni F. 1999. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. *Int. J. Pharm.* **180:** 23–30.

Leo E., Arletti R., Forni F., and Cameroni R. 1997. General and cardiac toxicity of doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles. *Farmaco* **52:** 385–388.

Leong K.W., Mao H.Q., Truong-Le V.L., Roy K., Walsh S.M., and August J.T. 1998. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Release* **53:** 183–193.

Ma J., Cao H., Li Y., and Li Y. 2002. Synthesis and characterization of poly(DL-lactide)-grafted gelatins as bioabsorbable amphiphillic polymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **13:** 67–80.

Marty J.J., Oppenheim R.C., and Speiser P. 1978. Nanoparticles—A new colloidal drug-delivery system. *Pharm. Acta Helv.* **53:** 17–23.

Mehvar R. 2000. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J. Control. Release* **69:** 1–25.

Michaelis M., Langer K., Arnold S., Doerr H.W., Kreuter J., and Cinatl J., Jr. 2004. Pharmacological activity of DTPA linked to protein-based drug carrier systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323:** 1236–1240.

Moghimi S.M., Hunter A.C., and Murray J.C. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **53:** 283–318.

Oppheneium R.C. 1986. Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatin and albumin. In *Polymeric nanoparticles and microspheres* (ed. P. Guiot and P. Couvreur), pp. 1–25. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Panyam J. and Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55:** 329–347.

Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., and Rudzinski W.E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **70:** 1–20.

Speiser P.P. 1991. Nanoparticles and liposomes: A state of the art. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **13:** 337–342.

Suh J.K. and Matthew H.W. 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials* **21:** 2589–2598.

Truong-Le V.L., August J.T., and Leong K.W. 1998. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum. Gene Ther.* **9:** 1709–1717.

Truong-Le V.L., Walsh S.M., Schweibert E., Mao H.Q., Guggino W.B., August J.T., and Leong K.W. 1999. Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Arch. Biochem. Biophys.* **361:** 47–56.

Vandervoort J. and Ludwig A. 2004. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57:** 251–261.

Weber C., Coester C., Kreuter J., and Langer K. 2000. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **194:** 91–102.

Zillies J. and Coester C. 2005. Evaluating gelatin based nanoparticles as a carrier system for double stranded oligonucleotides. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7:** 17–21.

Zwiorek K., Kloeckner J., Wagner E., and Coester C. 2004. In vitro gene transfection with surface modified gelatin nanoparticles. In *Proceedings of the International Conference on MEMS and NANO and Smart Systems*, August, 2004, pp. 60–63. IEEE Computer Society, Banff, Alberta, Canada.

———. 2005. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7:** 22–28.

# 第五十三章　水泡性口炎病毒 G 蛋白结合物

Atsushi Miyanohara

UCSD Program in Human Gene Therapy，University of California School San Diego of Medicine，La Jolla，California 92093-0692

王均　译



## 摘要

水泡性口炎病毒的外壳融合 G 蛋白（VSV-G）可以用于制备假型反转录病毒和假慢病毒，这种糖蛋白也可以单独作为有效的基因转移载体。在没有其他病毒成分存在的情况下，经 VSV-G 表达质粒转染的细胞将 VSV-G 蛋白分泌到培养基中，并可以通过蔗糖层超速离心法将其部分纯化。将 VSV-G 与质粒 DNA 混合可形成蛋白质-DNA 复合物，实验证明，将这种复合物加到受体细胞的培养基中可以显著提高细胞转染效率。复合物介导基因转移的细胞嗜性类似于 VSV-G 假型反转录病毒和慢病毒载体，因此用它转染其他方法难以转染的细胞时特别有效。然而仍然有些细胞难以被 VSV-G/DNA 复合物转染。同时值得注意的是，过量的 VSV-G 可能对受体细胞产生较严重的毒性。这种由病毒外壳融合蛋白和裸 DNA 制备的复合物提供了一种综合病毒和非病毒载体特点的安全有效的基因转染方法。

## 引言

VSV-G 蛋白是细胞生物学和病毒学研究的一个非常有用的试剂。众所周知，VSV-G 蛋白能够取代许多其他病毒包装蛋白，产生具有新的宿主范围和细胞嗜性的假型病毒颗粒（Zavada 1982）。因此 VSV-G 蛋白常被作为一种有效的替代外壳蛋白来制备假型反转录病毒和慢病毒载体（Emi et al. 1991；Burns et al. 1993；Yee et al. 1994b；Naldini et al. 1996；Poeschla et al. 1996）。由于 VSV-G 蛋白的稳定性和泛嗜性的特征，VSV-G 假型载体可以具有很高的效价，并能有效地将基因转移到多种不同类型的细胞，其中包括难以用其他方法来实现基因转移的非哺乳动物细胞（Burns et al. 1993）。我们已经用实验证明，在没有其他病毒成分存在的情况下，经 VSV-G 表达质粒转染的细胞

将 VSV-G 蛋白分泌到培养基中。在不存在细胞的情况下，从培养基中部分纯化的 VSV-G 蛋白能导入到未成熟和非感染性鼠白血病病毒和人类免疫缺陷病毒 1 型病毒样颗粒（VLP）的膜中，在体外组装成感染性病毒颗粒（Abe et al. 1998b; Sharma et al. 2000）。我们同时还证明 VSV-G 可以物理导入到 lipofectin-DNA 脂质体复合物，生成融合型 VSV-G 脂质体，它可以有效提高转染效率，而且不受血清的影响（Abe et al. 1998a）。我们进一步发现，在没有其他病毒组分或其他融合因子的存在下，VSV-G 可以和裸 DNA 结合，形成的复合物可以显著增强多种受体细胞的转染（Okimoto et al. 2001）。

无论 DNA-VSV-G 介导基因转移的机制如何，它可能更接近病毒转导而不是物理转染，这一点获得以下现象的支持，因为对其他转染方法相对耐受的几种细胞对 VSV-G 假型反转录病毒和慢病毒载体却具有显著增强的易感性。本章介绍在没有细胞的情况下，体外从病毒组分中组装病毒样 DNA 载体的方法。这种 DNA-VSV-G 复合物还可以进一步进行细胞靶向、高效核转运和定点整合等方面的修饰。

## 方案

# 制备 VSV-G 结合物并用于基因传递

这个操作方法描述 VSV-G 及用于基因传递的 DNA-VSV-G 复合物制备的简便方法。

## 材料

### 试剂

- 抗-VSV-G 单克隆抗体 P5D4（Sigma-Aldrich）
- BCA 蛋白质定量试剂盒（Pierce，Rockford，Illinois）
- 细胞培养基
- HEK293 细胞（ATCC）
- 磷酸盐缓冲液（PBS）
- 质粒
    - 报道基因表达质粒（如 EGFP-N1，BD Biosciences，Palo Alto，California）
    - VSV-G 表达质粒 pHCMV-G（Yee et al. 1994a，b）
- Polybrene（4mg/ml 储液）
- SDS-PAGE 和银染试剂
- Western blot 分析试剂
- 受体细胞
- 蔗糖（20%）/PBS

### 仪器

- 离心机，配备 SW 28 转子和离心管（Beckman）

SDS-PAGE 和银染设备
Western blot 分析设备
微孔滤膜（0.45μm）
细胞板（6 孔）
组织培养皿（10cm）
37℃水浴

## 方法

### 制备 VSV-G

任何转染方法都可以把 VSV-G 表达质粒转入到细胞中，以表达 VSV-G 蛋白。我们一般选用 HEK293 细胞系，因为它可以用包括 $CaPO_4$-DNA 共沉淀在内的任何方法进行转染，而且都具有高的转染效率（Yee et al. 1994a，b）。

1. 转染 24h 前，在 10cm 培养皿中，用合适的培养液，以大约 70% 的细胞密度接种 HEK293 细胞，生长过夜。

   在转染时，细胞密度应该达到 90%～100%。

2. 用标准的 $CaPO_4$-DNA 共沉淀方法转染 10～20μg 的 pHCMV-G 质粒到 HEK293 细胞。

   因为 HEK293 细胞对 $CaPO_4$ 沉淀的毒性敏感，所以转染时间应短于 8h。

3. 第二天，更换新鲜培养液。

   因为 VSV-G 的融合作用，可能形成的多核体，但在这一时间应该还不明显。继续培养过夜。

4. 此时多核体应该非常明显。收集培养液，0.45μm 滤膜过滤，－70℃储存。加入新鲜培养液到细胞中，并继续培养过夜。
5. 许多细胞可能飘浮起来，收集培养液，同步骤 4 过滤。－70℃储存或进行纯化。

### 部分纯化 VSV-G（简单方法）

6. 部分纯化 VSV-G，步骤如下：
   a. 把转染 2d 和 3d 收获的培养基在 37℃水浴中解冻并混合。将培养液转移到 Beckman SW 28 转子专用离心管中，4℃以 25 000r/min 离心 2h，弃上清。用 5～10ml PBS 重悬沉淀。如果培养基多于 200ml，可用大容量转子 6000～7000r/min过夜离心来收集 VSV-G。
   b. 低速离心除去不溶性碎片（如 4℃，3000r/min 离心 10min）。把上清加到 20% 的蔗糖/PBS（5ml）中，置入 SW 28 转子的离心管中，用 PBS 覆盖并填满离心管，25 000r/min 离心 6h 或过夜。弃上清，用 100～200μl PBS 重悬沉淀。
   c. 用 BCA 蛋白质定量试剂盒测量 VSV-G 蛋白的浓度。蛋白质纯度经 SDS-PAGE、银染和 Western blot 分析估计，使用抗-VSV-G 单克隆抗体 P5D4。

### 用 VSV-G 转染

7. 转染前 24h，在 6 孔板中，用合适的培养基接种待转染细胞，培养过夜。

8. 减少孔中的培养液至每孔 1ml，加入 polybrene 到培养液中（4μg/ml）。在一个小离心管中，将 2～5μg 的质粒 DNA（如 pEGFP-N1）和 10μl 大约 1μg 的 VSV-G 溶液混合。将其快速加入到细胞中。

   也可以将质粒 DNA 直接加入到含有 1ml 培养液的细胞中，培养 15min 后，加入 polybrene 和 VSV-G。

9. 混匀，置入培养箱中培养 2～6h，然后每孔补加 1ml 新鲜培养基，继续培养。如果碎片较多，洗涤细胞并加 2ml 新鲜培养基。

10. 在 1～3d，测量转基因表达，以评估细胞的转染效率。

## 致谢

此工作部分由 NIH HL66941 资助。

## 参 考 文 献

Abe A., Miyanohara A., and Friedmann T. 1998a. Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *J. Virol.* **72:** 6159–6163.

Abe A., Chen S.-T., Miyanohara A., and Friedmann T. 1998b. In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein. *J. Virol.* **72:** 6356–6361.

Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8033–8037.

Emi N., Friedmann T., and Yee J.K. 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatits virus. *J. Virol.* **65:** 1202–1207.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F., Verma I.M., and Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272:** 263–267.

Okimoto T., Friedmann T., and Miyanohara A. 2001. VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Mol. Ther.* **4:** 232–238.

Poeschla E., Corbeau P., and Wong-Staal F. 1996. Development of HIV1 vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11395–11399.

Sharma S., Miyanohara A., and Friedmann T. 2000. Separable mechanisms of attachment and cell uptake during retrovirus infection. *J. Virol.* **74:** 10790–10795.

Yee J.K., Friedmann T., and Burns J.C. 1994a. Generation of high-titer, pantropic retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43:** 99–112.

Yee J.K., Miyanohara A., LaPorte P., Bouic K., Burns J.C., and Friedmann T. 1994b. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 9564–9568.

Zavada J. 1982. The pseudotype paradox. *J. Gen. Virol.* **63:** 15–24.

# 第五十四章 筛选聚合物转染试剂的高通量方法

Gregory T. Zugates，Daniel G. Anderson 和 Robert Langer
Department of Chemical Engineering，Massachusetts Institute of Technology，Cambridge，Massachusetts 02139
王均 译



## 摘要

我们在研究阳离子型可降解基因载体材料的努力中，发展了一种高通量评估聚合物介导基因转染的方法。这种技术的最大优点之一是可以使用 96 孔板，方便地平行调节各种转染参数，并优化转染效果。通过改变材料的特性和转染条件，可方便地通过这一方法确定聚合物结构、聚合物和 DNA 的比例、DNA 浓度、细胞类型以及细胞密度对转染效率的影响。通过该方法，一天之内可以在使用极少量试剂的情况下，平行 4 次测试数以百计的聚合物转基因的能力。这一技术可自动化，用来高效及可重复测试大量的材料。这种技术的局限性之一在于需要储备大量不同类型的培养板、溶液以及实验装置，并且要经过消毒处理。此外，由于同时以非常小的体积处理所有的聚合物材料，很难确保对每一个聚合物的每一步骤都同样有效，因而难以保证溶液的均一性和合适的聚合物-DNA 复合物的形成。尽管如此，这种高通量方法已经成功应用于聚阳离子基因载体的筛选。这将是未来发展基因传递系统的一个十分有效的平台。

## 引言

发展安全有效的基因传输系统是确保临床基因治疗成功的先决条件。尽管病毒载体的转基因效率高，但出于安全性及病毒免疫原性的考虑，研究人员开始寻找替代病毒的非病毒载体材料（Nishikawa and Huang 2001；Check 2003）。聚阳离子作为其中一类非病毒载体极具潜力（De Smedt et al. 2000；Merdan et al. 2002；Wagner 2004），它可以通过静电作用与质粒 DNA 形成纳米尺度的复合物，在一些情况下，这些复合物能被细胞有效吸收，并具有良好的转染效率。

到目前为止，已经报道了大量能和DNA形成复合物而且具备转染细胞能力的阳离子聚合物，包括阳离子型多聚肽（如聚赖氨酸和聚组氨酸）、多糖（如壳聚糖和二乙基氨乙基葡聚糖）、聚乙烯亚胺（PEI）及其衍生物、线性和树枝状聚酰胺-胺（PAMAM）等（Merdan et al. 2002；Pack et al. 2005）。此外，也有一些可水解的聚阳离子，它们的降解使DNA分子从复合物中解离，聚合物自身也因为降解容易被排出。这样的聚阳离子包括聚磷酸酯、聚4-羟基-L-脯氨酸酯、聚α-4-氨丁基-L-乙醇酸、聚β-氨基酯（Lim et al. 1999，2000；Lynn and Langer 2000；Zhao et al. 2003）。很多用于基因治疗的高分子载体含有三级胺，它们具有质子缓冲能力，有助于对抗内含体酸化的环境，从而抑制酸诱导DNA降解。而且，这些三级胺造成的渗透压梯度相信有助于破坏内含体并使得DNA复合体逃逸到细胞的细胞质中（Boussif et al. 1995）。尽管目前有关高分子基因载体的研究取得了很大进展，但高分子基因载体促进基因传递的准确机制仍不清楚。因此，充分说明了化学结构和细胞功能之间尚不十分明确的环节将极大地促进新型聚阳离子基因载体材料的发展。

发展合成聚阳离子转染试剂的关键是寻找稳定可靠的方法以筛选高效的载体材料和转染条件。实验中，我们必须对大量的参数进行控制和优化，如聚合物-DNA结合条件（包括混合方法、pH、离子强度、培养时间、浓度、两者比率等），转染介质（如类型、血清含量等），DNA剂量和细胞培养时间，细胞特异性和测量条件等。由于参数可变范围越来越大，转染材料不断增加，因此发展高通量的筛选方法以评估转染效率十分重要（Regelin et al. 2001；Anderson et al. 2003）。这些筛选方法既可以手工完成，也可以通过自动化系统来完成，后者一般是在微孔细胞培养板上完成。

在我们致力于合成大量聚（β-氨基酯）高分子库以用于基因传递的过程中，我们发明了高通量、用96孔板来测试载体材料体外转染细胞能力的方法（Akinc et al. 2003b；Anderson et al. 2003，2005）。这一过程的示意图如图1。整个转染过程包括在5块96孔板上的4个独立的操作步骤。左边的第一块板含有聚合物的水溶液，板的第一排的12个孔中是10个待测试的聚合物、1个阳性对照（如PEI）和1个空白对照（也就是没有聚合物）。这些浓溶液在第二块96孔板中稀释（步骤1）。这块板的每排含有不同稀释度的待测载体溶液，这样可以测试多种聚合物和DNA的比例。这里我们只选择两种稀释比例，但根据需要，完全可以尝试更多的稀释比例，以测试更多的聚合物和DNA的比例。在步骤2中，4份稀释的聚合物溶液被转移到含DNA的第三块板的4排孔中。这样同一聚合物/DNA比例将被平行测试4次。第三步将复合物在培养液中稀释以获得需要的DNA浓度（步骤3），并最终转移到细胞中（步骤4）。这一程序可以使我们平行4孔，以两种聚合物/DNA比例，同时测试11个聚合物（包括阳性对照）。以下重点介绍对可水解pH敏感性的聚阳离子如聚β-氨基酯测试时应该注意的问题。

在转染前一天，将细胞种在96孔板中，以便细胞有足够的时间黏附到板表面。不透明白板是化学荧光测量的最佳选择，这样可以减少测量蛋白质表达水平时的孔间干扰。对于不同的聚合物和细胞来说，最佳的细胞密度可能有所不同（Gebhart and Kabanov 2001）。如果需要的话，用这一方法测试不同浓度细胞密度的影响也很容易。

高通量的转染从准备聚合物水溶液和DNA溶液开始。许多水溶性的聚合物，如PLL、PEI和PAMAM，可以将聚合物在很宽的pH范围溶解在合适的缓冲液中。然

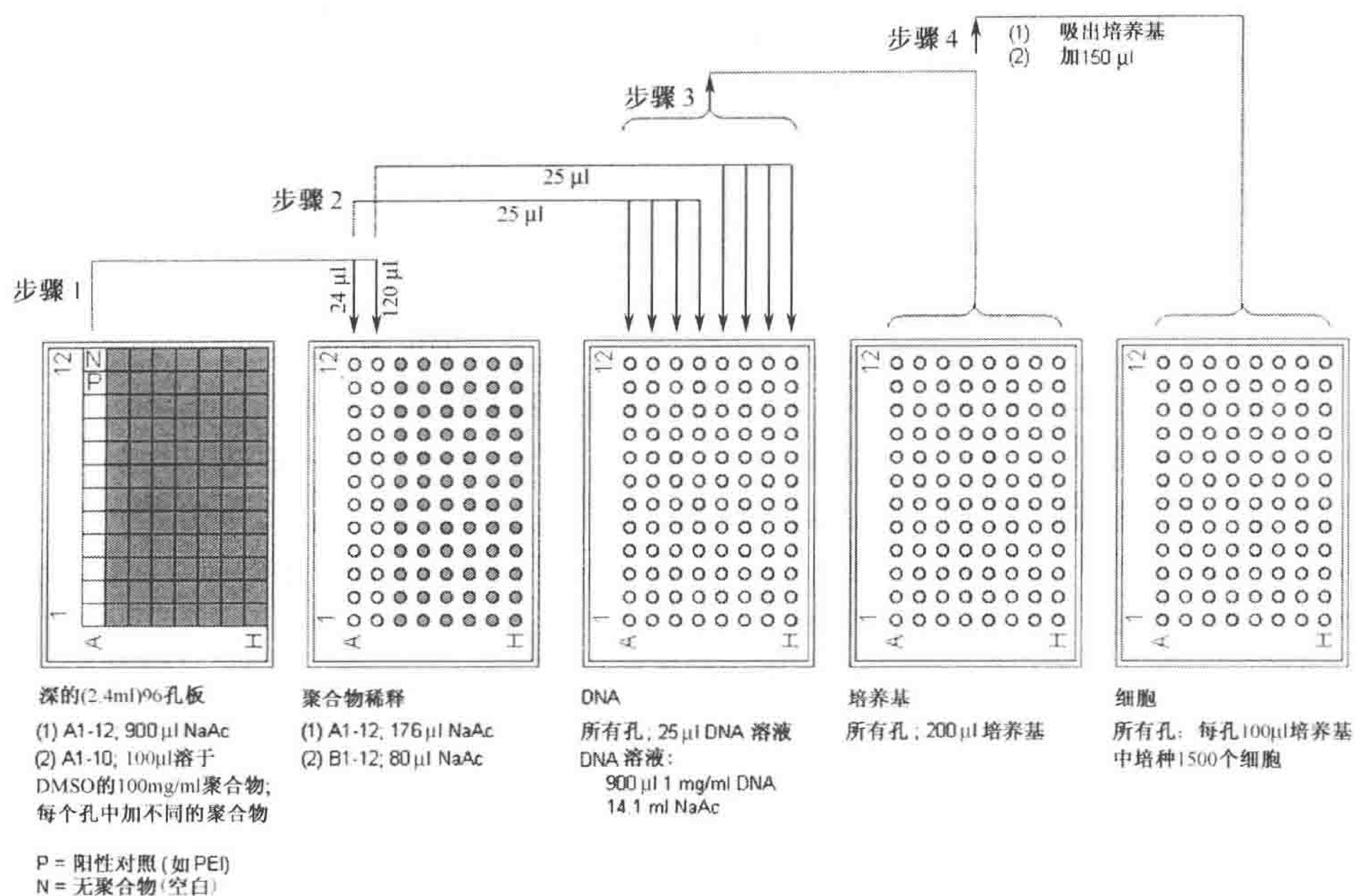



图 1．96 孔板的编排和高通量转染的步骤。所有溶液及转移步骤都以微升计量。此外，4 次转移均使用 12 通道移液枪完成。板中有阴影部分表示这些孔未用。在实验之前，事先准备好所有溶液，并在进行下一步操作之前转移到合适的培养板中。第一块板含有乙酸钠缓冲液（1），并用于溶解聚合物（2），每孔中的聚合物均不同。第二块板中只含缓冲液，用来稀释聚合物至合适浓度（步骤 1）。两个稀释液对应的聚合物：DNA 质量比分别为 20：1 和 100：1。每孔中的溶液为 200μl，足够平行测试 4 次。同一浓度的聚合物溶液平行 4 份和 4 排 DNA 溶液混合（步骤 2）。然后稀释聚合物-DNA 复合物到培养液中（步骤 3），并最终加入到细胞中（步骤 4）。

而，有些阳离子聚合物在生理或更高的 pH 下，几乎完全不溶，但在酸性缓冲液中，具有一定的溶解度。这些聚合物可以先用与水互溶、毒性较低的溶剂溶解，然后用酸性缓冲液，如乙酸盐或其他无氨基的缓冲液稀释。大多数聚 β-氨基酯需要在低 pH 下溶解，以确保主链上的三级胺质子化，能够和 DNA 形成复合物，却在几个小时内不显著影响 DNA 的结构完整性（Walter et al. 1999）。溶解聚合物时，对离子强度也要进行合适选择，不至于造成培养液的 pH 明显下降。对聚合物的储液进行合适的稀释，可以测试不同的聚合物/DNA 比例的影响（图 1，步骤 1）。以上因素对转染效率具有重要影响（Akinc et al. 2003a）。

将一定浓度的 DNA 储液用酸性缓冲液稀释制备 DNA 工作液。DNA 浓度是影响聚合物-DNA 复合物的物理特性和随后转染效率的重要变量。尽管高 DNA 浓度会造成细胞内吞增加和更高的蛋白质表达，但同时也可能造成增加的细胞毒性。因此，DNA 的剂量必须控制在蛋白质表达所能测量的范围内，并限制毒性。所用的质粒是 pCMV-Luc，CMV 是细胞巨化病毒的启动子，Luc 代表萤光素酶报道蛋白。采用这一表达系统是因为：①它非常敏感；②在几级对数浓度范围内，相对萤光单位（RLU）值和萤光素酶浓度呈线性关系；③方便用 96 孔板分析。

运用多通道移液枪或者机械液体处理系统，将稀释的聚合物溶液加入到DNA中，以形成聚合物-DNA纳米颗粒（图1，步骤2）。溶液需静置5min，待聚合物-DNA纳米颗粒形成。依赖于聚合物以及聚合物和DNA的比例，制备的带正电荷的复合物的粒径为70～200nm（Anderson et al. 2005）。影响其复合物尺寸、电荷、形貌的因素包括聚合物结构（如化学功能团和分子质量）、聚合物和DNA的浓度（绝对浓度和相对值）、混合动力学、结合时间、温度和溶剂特性（pH和离子强度）（Reschel et al. 2002；Neu et al. 2005）。

在复合物加入到细胞之前，用不同的96孔板来稀释聚合物-DNA复合物，这样可以得到合适的浓度，并方便调节pH。这一操作通常在没有细胞的板中进行，以避免剧烈的移液过程造成细胞的脱落和裂解。随着培养液中血清浓度的升高，聚阳离子的转基因效率倾向于变低，这是因为血清中带负电荷的蛋白质和带正电荷的聚合物-DNA复合物存在相互作用（Forrest et al. 2004）

将一定量的聚合物-DNA复合物用转染液稀释后（图1，步骤3），加入到培养的细胞中（图1，步骤4）。聚合物-DNA复合物和细胞培养时间会影响转染结果，我们选择1h的培养时间是因为更长的培养时间并不会造成特别高的蛋白质表达。移出复合物后，用新鲜的培养液继续培养细胞。

蛋白质的表达水平在转染3d后测定。这个时间比较合适，但高水平的蛋白质表达在转染后的第1天就可以测量到。萤光素酶蛋白可以用Bright Glo Assay Kits试剂盒（Promega）测量，每孔测量时间为1s。通过萤光素酶标准曲线，可以将RLU值转换成萤光素酶的质量。尽管这种方法非常敏感，但由于自身不稳定，半衰期仅为30min。因此，加入底物后，应在最短时间内进行测量，整块板的测量应该在2min内完成。

## 方案

# 高通量方法筛选聚合物转染试剂

以下描述用96孔板高通量筛选聚合物转染试剂。这一方法可以方便地在4d内筛选成百计的聚合物。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Bright-Glo Kits (Promega)

COS-7细胞，一种非洲绿猴的肾成纤维细胞系，适合被需要表达SV40 T抗原的载体转染（ATCC：CRL-1651）

二甲亚砜（DMSO，＞99.7%无菌过滤）(Sigma-Aldrich）＜!＞

DMEM培养基［每500ml含50ml胎牛血清（FBS）和5ml青霉素-链霉素＜!＞］（Invitrogen 21063-029，10082-147，25200-056）

萤火虫萤光素酶（Promega）

pCMV-Luc DNA（1mg/ml 水溶液，－20℃储存）（Elim Biopharmaceuticals）

支化 PEI，分子质量 25kDa（Sigma-Aldrich）<!>

乙酸钠溶液（3mol/L，pH 5.2，0.2μm 膜过滤）（Sigma-Aldrich）<!>

胰蛋白酶（Invitrogen 25200-056）

### 仪器

12 道吸液器（V&P Scientific），高压蒸汽灭菌

离心管（15ml，无菌）

96 孔板（Corning Costar 3695），在带层流的细胞培养超净台 UV 照射 1h 消毒

细胞计数板（VWR）

培养箱（37℃，5%$CO_2$；Forma Scientific）

小离心管（1.5ml，无菌；Eppendorf，VWR）

微量移液枪（Eppendorf）

- 5～50μl 12 通道
- 50～300μl 12 通道
- 100～1000μl 单通道
- 20～200μl 单通道

涡旋振荡器（备选）

移液枪头，高压蒸汽灭菌 30min

- 1～200μl 4 盒（U. S. Scientific）
- 100～1000μl（U. S. Scientific）

移液池，无菌（VWR）

细胞板（96 孔）

- 多孔平底带盖板（2 块；BD Falcon，无菌，BD 353072）
- 多孔板，96 孔（2.4ml），V 形底，Greiner Polypropylene（Sigma-Aldrich M1561）
- 组织培养板，白色 96 孔板（无菌；Corning Costar 3917）

萤光素酶板计数仪（Perkin Elmer）

计时器（VWR）

组织培养滤器，500ml，0.2μm 醋酸纤维素膜（无菌；Nalgene）

水浴，室温

## 方法

所有的操作都必须在层流细胞培养超净台中完成，所有试剂和设备均经无菌处理。我们假定读者熟悉基本的无菌细胞培养技术，包括细胞生长、传代和接种细胞。

1. 在转染前一天，以每孔 $1.5\times10^4$ 在白色细胞培养 96 孔板接种 COS-7 细胞（图 1，板 5）。

2. 在无菌的小离心管中，用 200μl DMSO 溶解 20mg 不同聚合物，制备 100mg/ml 的聚合物溶液。用 1ml DMSO 溶解 10mg PEI，制备 10mg/ml 的 PEI 溶液作为阳性对照。
3. 用 495.8ml 蒸馏水稀释 4.2ml 3mol/L 的乙酸钠溶液，配置 500ml 25mmol/L 的乙酸钠缓冲液（pH 5.2），用 Nalgene 组织培养过滤器真空过滤除菌。
4. 吸取 30ml 25mmol/L 乙酸钠缓冲液到移液池中，用多通道移液枪在 BD Falcon 96 孔板的 A 和 B 排中分别加入 176μl 和 80μl 上述缓冲液（图 1，板 2）。按这一操作方法，最终聚合物和 DNA 比例将分别为 20∶1 和 100∶1。此外，在 Greiner 96 孔 V 形底板的 A 排中，每孔加入 900μl 缓冲液（图 1，板 1）。
5. 室温水浴解冻 pCMV-Luc DNA 储液，在 15ml 无菌离心管中，用 9.4ml 25mmol/L 的乙酸钠缓冲液稀释 600μl 1mg/ml 的 DNA 储液。将稀释的 DNA 溶液转移到移液池中，向 96 孔板每孔加入 25μl（图 1，板 3）。
6. 在 37℃水浴温浴培养液 15min。转移培养液到移液池中，在 BD Falcon 96 孔板中每孔加入 200μl 培养液（图 1，板 4）。
7. 在 Greiner 96 孔板的 A 排（含 900μl 乙酸钠缓冲液），对应加入 100mg/ml 的聚合物/DMSO溶液和阳性对照，每孔 100μl（图 1，板 1）。用移液枪混匀以确保聚合物溶解均匀。

以下所有转移操作均用 12 通道移液枪完成。

8. 准备聚合物稀释液（图 1，步骤 1）：
   a. 从 Greiner 96 孔板的 A 排转移 24μl 聚合物溶液到含有 176μl 乙酸钠缓冲液的聚合物溶液稀释板的 A 排中。
   b. 从 Greiner 96 孔板的 A 排转移 120μl 聚合物溶液到含有 80μl 乙酸钠缓冲液的聚合物溶液稀释板的 B 排中。
   c. 用移液器吹打溶液，确保溶液混合均匀。
9. 准备聚合物-DNA 复合物（图 1，步骤 2）
   a. 从聚合物溶液稀释液板的 A 排，转移 25μl 聚合物溶液，依次加入到含 25μl DNA 的 DNA 板的 ABCD 四排中。
   b. 从聚合物溶液稀释液板的 B 排，转移 25μl 聚合物溶液，依次加入到含 25μl DNA 的 DNA 板的 EFGH 四排中。
   c. 计时 5min。每一次转移均用移液枪反复吹打，以确保溶液混合均匀并促进聚合物-DNA 结合。每次加样前要换枪头，防止孔间污染。混合技术对获得可重复的转染结果非常重要。
10. 5min 后，从 DNA 板的 A 排吸取 30μl 聚合物-DNA 复合物，加入到每孔含 200μl 培养液的培养液板的 A 排中（图 1，步骤 3），依次重复其他排的操作。每一次加样均用移液枪吹打几次，确保溶液混合均匀。每次加样要更换枪头，防止孔间污染。
11. 将聚合物-DNA 复合物加入到细胞中（图 1，步骤 4）。
   a. 用 12 通道的吸液器吸去整块细胞培养板的培养液，确保培养液吸净。
   b. 从培养液板的 A 排中，吸取 150μl 聚合物-DNA 复合物到细胞培养板的 A 排中。
   c. 依次重复其他排的操作。每次加样更换枪头。加样时，枪头与细胞培养板成一定角度，沿孔壁加入，避免直接在细胞的上方加样，以减小加样带来的液体流

动和涡旋力，从而避免将细胞冲悬。

d. 将细胞放回到培养箱中，计时培养 1h。

12. 1h 后，从细胞中吸除聚合物-DNA 溶液，每孔加入 105μl 新鲜培养液，继续培养细胞。

13. 分析萤光素酶蛋白的表达。萤光素酶蛋白表达的分析通常在转染后 1～5d 进行，对于 COS-7 细胞，转染后 3d 比较合适。

a. 室温水浴解冻 Bright Glo Luciferase Assay Kit 至少 1h。

b. 将缓冲液加入到底物管，盖好，倒转几次以混匀，转移到移液池中。

c. 用多通道移液枪，在细胞板每孔中加入 100μl 溶液，加完后，计时 2min，轻摇板，或用涡旋振荡器混合。

d. 2min 后，在读板仪上测量萤光强度，时间为 1s。对应于标准曲线，计算萤光素酶蛋白表达的量。

## 参考文献


Akinc A., Anderson D.G., Lynn D.M., and Langer R. 2003a. Synthesis of poly(β-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **14:** 979–988.

Akinc A., Lynn D.M., Anderson D.G., and Langer R. 2003b. Parallel synthesis and biophysical characterization of a degradable polymer library for gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **125:** 5316–5323.

Anderson D.G., Lynn D.M., and Langer R. 2003. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42:** 3153–3158.

Anderson D.G., Akinc A., Hossain N., and Langer R. 2005. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β-amino esters). *Mol. Ther.* **11:** 426–434.

Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., and Behr J.P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 7297–7301.

Check E. 2003. Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy. *Nature* **423:** 573–574.

De Smedt S.C., Demeester J., and Hennink W.E. 2000. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **17:** 113–126.

Fischer D., Li Y.X., Ahlemeyer B., Krieglstein J., and Kissel T. 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24:** 1121–1131.

Forrest M.L., Meister G.E., Koerber J.T., and Pack D.W. 2004. Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharm. Res.* **21:** 365–371.

Gebhart C.L. and Kabanov A.V. 2001. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release* **73:** 401–416.

Gosselin M.A., Guo W.J., and Lee R.J. 2001. Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjug. Chem.* **12:** 989–994.

Kircheis R., Wightman L., and Wagner E. 2001. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv. Drug Delivery Rev.* **53:** 341–358.

Lim Y.B., Choi Y.H., and Park J.S. 1999. A self-destroying polycationic polymer: Biodegradable poly(4-hydroxy-L-proline ester). *J. Am. Chem. Soc.* **121:** 5633–5639.

Lim Y.B., Han S.O., Kong H.U., Lee Y., Park J.S., Jeong B., and Kim S.W. 2000. Biodegradable polyester, poly[α-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm. Res.* **17:** 811–816.

Lynn D.M. and Langer R. 2000. Degradable poly(β-amino esters): Synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **122:** 10761–10768.

Merdan T., Kopecek J., and Kissel T. 2002. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Delivery Rev.* **54:** 715–758.

Neu M., Fischer D., and Kissel T. 2005. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J. Gene Med.* **7:** 992–1009.

Nishikawa M. and Huang L. 2001. Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **12:** 861–870.

Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., and Stayton P.S. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4:** 581–593.

Regelin A.E., Fernholz E., Krug H.F., and Massing U. 2001. High throughput screening method for identification of new lipofection reagents. *J. Biomol. Screen.* **6:** 245–254.

Reschel T., Konak C., Oupicky D., Seymour L.W., and Ulbrich K. 2002. Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J. Control. Release* **81:** 201–217.

Wagner E. 2004. Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: Will "artificial viruses" be the answer? *Pharm. Res.* **21:** 8–14.

Walter E., Moelling K., Pavlovic J., and Merkle H.P. 1999. Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): Stability issues and release characteristics. *J. Control. Release* **61:** 361–374.

Zhao Z., Wang J., Mao H.Q., and Leong K.W. 2003. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55:** 483–499.

# 第五十五章　基于聚乳酸和聚乙二醇的纳米基因载体

Nœ́ mi S. Csaba，Alejandro Sánchez 和 Maria Jose Alonso
Deparment of Pharmaceutical Technology，School of Pharmacy，University of Santiago de Compostela，15782，Santiago，Spain
王均　译



## 摘要

复合聚乳酸-聚羟基乙酸（PLGA）和聚乙二醇（PEG）衍生物的纳米颗粒已经被用作为透黏膜的基因载体。这种纳米载体的优势来源于其固有的生物可降解性、组分的低毒性和温和的制备条件。此外，在体内应用时，还有以下的优点：①足够的 DNA 包载率；②在保护 DNA 构象与生物活性的同时，可以控制 DNA 的释放；③可以克服鼻黏膜障碍，将 DNA 疫苗转运到细胞，与编码蛋白质相比，能够诱导更强的系统免疫反应。

## 引言

迄今为止，在所有高效的基因转运中，将聚乳酸（PLA）或聚羟基乙酸（PLGA）与聚乙二醇（PEG）衍生物以共聚物或共混形式结合来制备生物可降解纳米颗粒是体内应用的一个极有前景的策略。事实上，这种新型生物可降解纳米颗粒已经作为生物活性蛋白质或抗原的载体，并具有透黏膜的潜力（Sánchez et al. 2003；Vila et al. 2004b）。因此，我们最近评估了这种纳米载体作为透黏膜基因载体的可能性。我们使用 PLA-PEG 共聚物制备纳米颗粒，或将 PLGA 与 poloxamer 和 poloxamine 之一共混制备纳米颗粒，希望能解决以下 3 个问题：①纳米颗粒中 DNA 分子的稳定性；②实现在较长时间内的基因控制释放；③有效转运基因，穿透黏膜表面。这些纳米颗粒的粒径为100～

400nm，表面电位为－45～－25mV。通过改变聚合物的结构或共混物的组成可以方便地调节这些参数（Pérez et al. 2001；Csaba et al. 2004）。DNA 包封效率较高，为 30%～90%，取决于纳米颗粒的组成。而且这些纳米颗粒能在一到几周的时间内控制释放所包载的质粒 DNA，释放速度与纳米颗粒的组成相关，如 PLGA 与 PEO 衍生物共混的纳米颗粒在 1～2 周释放所包载的质粒 DNA，而 PLA-PEO 共聚物释放速度则较慢（Pérez et al. 2001；Csaba et al. 2005），因此，根据需要，可以选择合适的载体控制 DNA 的释放行为。

与用于细胞转染的商业化试剂相比，体外转染效率低是这类纳米载体的主要缺点。另外，由于 PLA、PLGA、PLGA-PEG 和一些 PEO 衍生物相对疏水，在水体系中不溶，在制备纳米颗粒时，使用有机溶剂溶解聚合物材料来包封遗传物质。因此，限制了这类纳米载体在细胞转染方面的应用。

基于 PLA 与 PEO 衍生物的纳米颗粒的最大优点在于它们的生物可降解性与低毒性，因此，这类纳米载体在体内应用极具潜力。另一优点是纳米颗粒能保护 DNA 的稳定性以及前面提到的延长 DNA 的释放时间，从而具有长时间基因表达的可能。此外，这类纳米载体不仅具有克服细胞障碍的能力，而且可以克服黏膜障碍。例如，利用共聚焦显微镜观察，我们发现包裹荧光染料的纳米颗粒能穿过鼻黏膜，并证明 PEO 对其稳定及穿透鼻黏膜的运输起着至关重要的作用（图 1，见彩版）（Tobío et al. 2000；Vila et al. 2004a；Csaba et al. 2005）。在另外一个实验中，用编码 β-galactosidase 的 pCMV-β-gal 质粒作为模型，我们证实基于 PLA-PEG 的共聚物和 PLGA/poloxamer 物理共混的纳米颗粒都能将质粒 DNA 转运穿透鼻黏膜。事实上，如图 2 所示，通过鼻腔的单剂 PLA-PEG 纳米颗粒给药（DNA），诱导小鼠对编码蛋白质的显著系统免疫反应（Vila et al. 2002），而且明显高于裸 DNA 诱导的免疫反应。最近用 PLGA/poloxamer 共混物的纳米颗粒也观察到相似的结果。总之，这些结果表明了这类纳米载体可以作为透黏膜基因传递的载体，在 DNA 疫苗应用方面具有较好的前景。

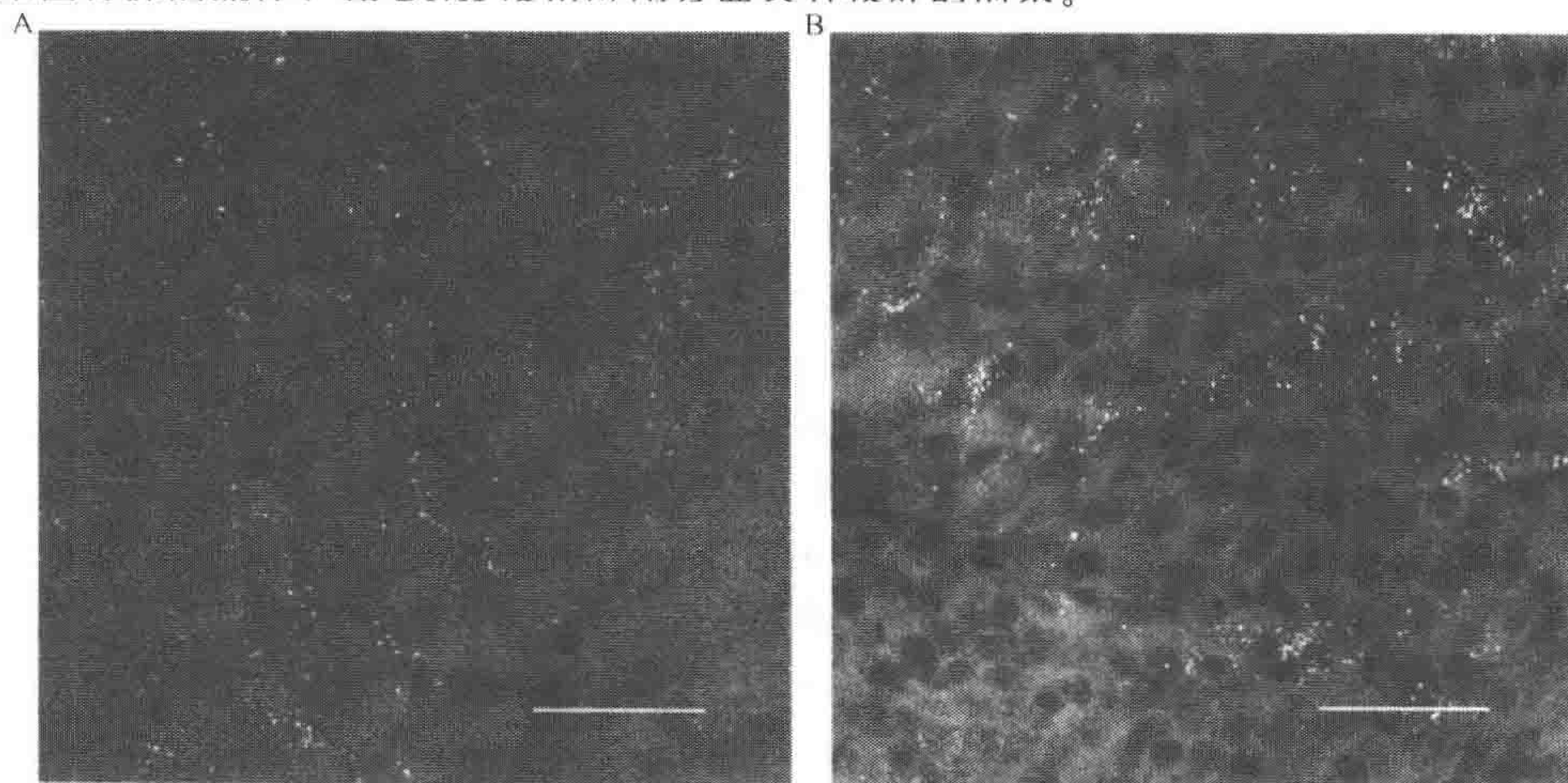



图 1. 包载罗丹明的 PLA-PEG 共聚物纳米颗粒穿透鼻黏膜的激光共聚焦照片：A. 表面；B. 累积内部切片。标尺，25μm（经允许复制自 Vila et al. 2004a.［© Elsevier］）。

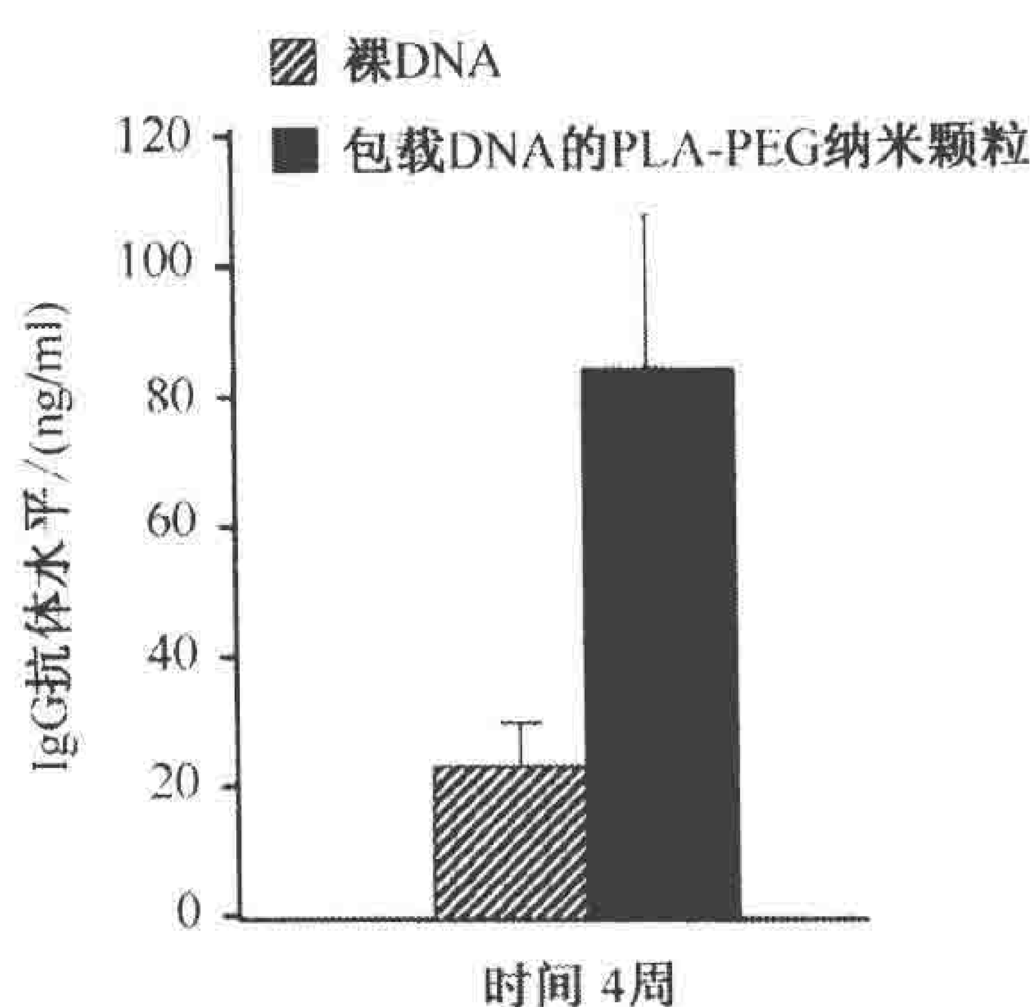



图 2. 经鼻腔给药后（裸 DNA 或包载 DNA 的 PLA-PEG 纳米颗粒）血清中特异性 IgG 抗体水平（经允许复制自 Vila et al. 2002 [© Wiley]）。

**方案**

# 基于 PLGA 与 PEG 纳米基因载体的制备

本部分描述由基于 PLA 与 PEO 并包载 DNA 的纳米基因载体的制备和表征，以及用这些纳米颗粒作为透黏膜基因载体的实验方法。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖凝胶（1%）
乙醇
乙酸乙酯<!>
二氯甲烷<!>
磷钨酸染色溶液（2%）<!>
Picogreen 试剂<!>（Molecular Probes，Invitrogen）
质粒：pCMV-β-gal 载体（Elim Biopharmaceuticals）
Poloxamer：具有不同的亲水-亲油比值（HLB），及不同的链段长度
    Piuronic F68 与 Piuronic L121（BASF，Germany）
Poloxamine：具有不同的亲水-亲油比值（HLB），及不同的链段长度
    Tetronic 904 与 Tetronic 908（BASCOM，Belgium）
聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物（PLA-PEG，Alkermes，Ohio）
聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物（PLGA，Boehringer Ingelheim）
聚乙烯醇（PVA）<!>水溶液（1%与 0.3% *m/V*）
ELISA 试剂

## 仪器

琼脂糖凝胶电泳设备与 ELISA 用酶标仪
超声波破碎仪（Sonifier，Branson，Barcelona，Spain）
荧光分光光度计
透射电子显微镜
真空干燥箱
粒度-表面电位仪 Zetasizer 3000 HS（Malvern Instruments）

# 方法

## 纳米颗粒的制备

1. 特定组成的纳米颗粒的制备

**PLGA/PEO 衍生物的共混物纳米颗粒**

通过溶剂置换技术制备。

a. 将 500μg 的质粒 DNA 溶于 200μl 的水相中。
b. 将 50mg 的 PLGA 与 50mg PEO 衍生物溶于 2ml 二氯甲烷中。
c. 将步骤 a 形成的水相与步骤 b 形成的油相混合，涡旋，形成油包水的乳液。
d. 向乳液中加入 25ml 极性溶剂（如乙醇），使聚合物以纳米颗粒形式沉淀。
e. 加入 25ml 水，并让有机溶剂充分挥发。收集纳米颗粒悬液。

**PLA-PEG 纳米颗粒**

可以用上述溶剂置换技术制备，也可以用双乳液技术制备。

a. 将 200μg 的质粒 DNA 溶于 200μl 的水相中。
b. 将 40mg 的 PLA-PEG 溶于 1.5ml 乙酸乙酯∶二氯甲烷（1∶1）的混合溶剂中。
c. 步骤 a 形成的水相与步骤 b 形成的油相混合，超声 5s。
d. 将上述乳液加入到 PVA 的水溶液（1% $m/V$）中，超声 5s（输出功率=10），形成双乳液（水包油-油包水）。
e. 将上述乳液在搅拌下加入到 50ml 0.3%（$m/V$）的 PVA 水溶液中，轻微搅拌，以使纳米液滴固化。
f. 真空下蒸发除去有机溶剂。

## 纳米颗粒的分离

2. 15℃，10 000 $g$ 的转速离心 1h 分离纳米颗粒。

   这样的条件可以使纳米颗粒最大量的沉淀，而不会使游离的质粒 DNA 沉淀。

3. 用水重悬纳米颗粒，轻轻振动或涡旋。

## 纳米颗粒的表征

4. 利用粒度分析仪测纳米颗粒的粒径（Zetasizer HS 3000）。
5. 用 Zetasizer HS 3000 测试 ζ 电势及分布。

6. 通过磷钨酸染色溶液（2%）染色，用透射电子显微镜观察纳米颗粒的大小和形态。
7. 采用 PicoGreen 荧光试剂，根据试剂提供商提供的操作方法，用荧光光度计测量 DNA 的结合效率（Molecular Probes，Invitrogen）。
8. 通过 1%的琼脂糖凝胶电泳分析释放的质粒 DNA 或从纳米颗粒萃取的质粒 DNA 的结构完整性。

### 体内基因表达

体内基因表达可以通过检测小鼠对编码蛋白质的免疫反应来研究。

9. 每隔 15min 向小鼠（6～9 只）鼻腔中滴入 10μl 悬浮的纳米颗粒（总量为 25μg CMV-β-gal，每个鼻腔 3 滴）。
10. 在预定时间点从小鼠尾静脉取血，4℃，3000*g* 离心 5min，收集血清，－20℃储存。
11. ELISA 法测定 IgG 与 IgA 的水平。

## 致谢

感谢 Xunta de Galicia 对此项研究的资助，同时感谢 Rafael Romero 参与体内实验的工作。

## 参考文献

Csaba N., Gonzalez L., Sanchez A., and Alonso M.J. 2004. Design and characterisation of new nanoparticulate polymer blends for drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **15:** 1137–1151.

Csaba N., Sanchez A., and Alonso M.J. 2005. PLGA-poloxamer and PLGA-poloxamine blend nanoparticles: New carriers for gene delivery. *Biomacromolecules* **6:** 271–278.

——. 2006. PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures for transmucosal delivery of genetic vaccines: In vitro and in vivo evaluation of uptake and transfection efficiency. *J. Control. Release* (in press).

Harris J.R., Roos C., Djalali R., Rheingans O., Maskos M., and Schmidt M. 1999. Application of the negative staining technique to both aqueous and organic solvent solutions of polymer particles. *Micron* **30:** 289–298.

Pérez C., Sanchez A., Putnam D., Ting D., Langer R., and Alonso M.J. 2001. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J. Control. Release* **75:** 211–224.

Sánchez A., Tobio M., Gonzalez L., Fabra A., and Alonso M.J. 2003. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18:** 221–229.

Tobío M., Sanchez A., Vila A., Soriano I., Evora C., Vila-Jato J.L., and Alonso M.J. 2000. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloid. Surf. B Biointerfaces* **18:** 315–323.

Vila A., Gill H., McCallion O., and Alonso M.J. 2004a. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: Effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release* **98:** 231–244.

Vila A., Sanchez A., Perez C., and Alonso M.J. 2002. PLA-PEG nanospheres: New carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polym. Adv. Technol.* **13:** 851–858.

Vila A., Sanchez A., Evora C., Soriano I., Vila-Jato J.L., and Alonso M.J. 2004b. PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *J. Aerosol Med.* **17:** 174–185.

# 第五十六章　生物可降解的纳米颗粒

Jaspreet K. Vasir[*] 和 Vinod Labhasetwar[*,†]

[*] Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, [†] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 68198-6025

王均　译



## 摘要

生物可降解纳米颗粒是一种胶体颗粒，一般直径在 100nm 左右，可以由聚乳酸 聚羟基乙酸（PLGA）或聚乳酸等生物可降解聚合物制备而成。这些纳米颗粒通过内吞作用进入细胞，并且研究证明它们可以快速从溶酶体逃逸，从而保护纳米颗粒以及所包载的 DNA 在溶酶体中不被降解（Panyam et al. 2002）。因此纳米颗粒中所包载的质粒 DNA 可以不被胞外和胞内核酸酶降解。DNA 从纳米颗粒中缓慢释放，可以持续传递基因，延长基因表达，因此生物可降解纳米颗粒与其他的非病毒基因传递体系不同，它是一个能持续表达基因的载体。

## 引言

纳米颗粒是直径为 100nm 左右包载目的基因的高分子胶体颗粒（Panyam and Labhasetwar 2003；Vasir and Labhasetwar 2006）。这些纳米颗粒用 FDA 批准的具有生物可降解性与良好生物相容性的 PLGA 或 PLA 制备。这些聚合物分子质量和组成不同，具有不同的降解速率。通过调节聚合物的组成可以获得预想的释放速率及基因表达时间。PVA 是一种常用的制备 PLGA 纳米颗粒的乳化剂，使用 PVA 作为乳化剂可以制备粒径相对单一并较小的纳米颗粒。由于纳米颗粒表面结合有聚乙烯醇分子，使其更容易重悬浮于水相中（Sahoo et al. 2002）。此外，乳化剂 PVA 的类型（包括分子质量与水解度）影响纳米颗粒的表面性质、DNA 包载率和颗粒粒径，进而影响基因的转染。我们先前的实验结果表明，相对分子质量为 30 000～70 000、水解度为 87%～89% 的 PVA 适合制备用于基因转染的纳米颗粒（Prabha and Labhasetwar 2004a）。

在生理 pH 条件下这些纳米颗粒表面具有电负性，在血清存在的介质中不会聚集，并且对不同的细胞系在高达 1000μg/ml 的浓度也不会引起细胞毒性。由于纳米颗粒聚合物基材的降解，使得包载的 DNA 在细胞内缓慢释放，因此而造成持续的基因传递和基因转染（Prabha and Labhasetwar 2004b）。牛血清白蛋白（BSA）与 DNA 一同使用可以促进所包载 DNA 的释放，特别值得一提的是，乙酰化的牛血清白蛋白由于不含核酸酶，有助于阻止 DNA 的降解。与阳离子脂质体或聚合物传递 DNA 的短暂高效的基因表达不同，由于 DNA 从纳米颗粒缓慢释放，纳米颗粒介导的基因转染效率低，但持续时间长。当表达蛋白质的半衰期较短或者为达到治疗效果而需要缓慢的基因传递时，持续的基因表达就更为有利（Prabha and Labhasetwar 2004b）。

## 方案

# 生物可降解纳米颗粒的制备及其在基因转染中的应用

本部分描述利用纳米颗粒包载 DNA 的方法及其在基因转染中的应用。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

乙酰化牛血清白蛋白（Ac-BSA；Sigma-Aldrich）
细胞裂解试剂（CCLR；Promega）或 Triton X-100（1.0% *m/V*）溶液<!>
待转染细胞
氯仿<!>
胎牛血清（FBS）
水（无菌）
异丙醇<!>
萤光素酶底物（如果利用萤光素酶为标记基因）（Promega）
细胞培养基
　　完全培养基（根据细胞系的不同，用 RPMI 1640 或其他的培养液），含 10%（*m/V*）胎牛血清
　　RPMI 1640 或其他的无血清的培养液（根据细胞系的不同而选择）
BCA 蛋白质检测试剂（MicroBCA kit，Pierce）
磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）
质粒 DNA（10mg/ml）
聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物（PLGA，聚乳酸：聚羟基乙酸=50：50，在六氟异丙醇中特性黏度为 1.32dl/g；Birmingham Polymers Inc.，Alabama）
聚乙烯醇（PVA）（分子质量 30 000～70 000；87%～89%水解度；Sigma-Aldrich）<!>

Tris-EDTA 缓冲液（pH 8.0，灭菌）<!>

仪器

离心管（50ml）
冻干机
滤膜（0.22μm；Millipore）
玻璃管（5ml）
冰浴
37℃培养箱
Microcentrifuge 离心管
24 孔板
恒温振荡水浴（37℃）
超声波发生器（XL 2015 sonicator ultrasonic processor ；Misonix Inc.）
紫外分光光度计
真空干燥箱

## 方法

包载质粒 DNA 的纳米颗粒通过乳化溶剂挥发法制得，每次可以制备含 30～90mg 聚合物的纳米颗粒。以下介绍含 30mg 聚合物的方法。

### 溶液的制备

1. 聚合物溶液的制备：搅拌下，在 5ml 玻璃管中，将 30mg PLGA 溶解在 1ml 氯仿中，要 3～4h 将聚合物完全溶解。
2. 制备质粒 DNA 溶液：将 1mg 质粒 DNA 溶液（10mg/ml）与 200μl Tris-EDTA 缓冲液混合，在不涡旋下加入 2mg 无核酸酶的乙酰化牛血清白蛋白，轻敲试管使 BSA 溶解。

   大约要 3h 将 BSA 完全溶解，也可以将 DNA 溶液与 BSA 在 4℃冰箱中储存过夜，以使 BSA 完全溶解。

3. 制备 2.0%（*m*/*V*）的 PVA 溶液：搅拌下，将 0.2g PVA（分子质量 30 000～70 000）缓慢加入到 10ml 冷的 Tris-EDTA 缓冲液中，大约需要 30min 溶解 PVA。在 4℃，1000r/min 离心 10min，并用 0.22μm 无菌膜过滤以除去不溶的 PVA。加入 10μl 氯仿使 PVA 溶液饱和。

### DNA 的包载

4. 将上述 DNA 溶液加入到两份各 100μl 的聚合物溶液中，涡旋 1min，形成油包水乳液。
5. 在冰水浴中用探针式超声器以 55W 的输出功率将乳液超声处理 2min。

   此处理过程可减小乳液液滴的大小。在超声前用异丙醇将超声波探针清洗干净，将探针置于乳液的中间，并防止在超声时探针与管壁接触。

6. 将乳液分两份加入到含 6ml PVA 的 50ml 离心管中，每次滴加后涡旋 1min，形成油包水-水包油（water-in-oil-in-water）的双乳液，同步骤 5 超声 5min。
7. 室温下，将得到的乳液在同一个管中缓慢搅拌过夜（约 18h），使氯仿挥发。
8. 为确保氯仿挥发完全，将悬浮的纳米颗粒在真空干燥箱中搅拌继续干燥 1h。
9. 在 4℃，110 000*g* 下超速离心 20min 收集纳米颗粒，同时收集上清液。
10. 将纳米颗粒重悬浮于 5ml Tris-EDTA 缓冲液中。首先用缓冲液反复冲洗纳米颗粒直到其全部悬浮，再同步骤 5 在冰浴中超声 30s。
11. 重复步骤 9 与 10 以除去游离的 DNA 和 PVA。
12. 用步骤 9 的上清液和步骤 11 的洗涤液确定未被包封的 DNA 的量，使用紫外分光光度计测试 260nm 的吸收。测试中，用制备不含 DNA 的纳米颗粒的步骤 9 的上清液和步骤 11 的洗涤液作为参照。
13. 用 1～2ml 的无菌水重悬浮纳米颗粒并超声 1min。4℃，1000r/min 离心纳米颗粒悬浮液 10min，以除去可能存在的纳米颗粒聚集体。
14. 收集悬浮液并存放于称量过的离心管中（如果有必要可以分成几份），在－80℃下冷冻 45min，冻干 2d，得到干燥的固体粉末。

    在 4℃下储存冻干的纳米颗粒。

## 转染方法

15. 在 24 孔板中以 $3.5\times10^4$ 个细胞/（孔・ml）的密度接种待转染的细胞，使用完全培养基，平行 6 孔。以同样的细胞密度，不加纳米颗粒作为对照。
16. 细胞在 24 孔板中培养 24h。
17. 在无菌环境用 0.5ml RPMI 1640 重悬包载 DNA 的 4mg 纳米颗粒（针对不同细胞，也可使用其他无血清的培养液）。在水浴超声器中超声 10min。
18. 用含有 10% FBS 的 RPMI 1640（或其他适合细胞生长的营养液）将纳米颗粒悬液稀释至 9ml。
19. 吸去细胞培养板中的营养液，并加入 1ml 上述纳米颗粒悬液。
20. 在 37℃，5%$CO_2$ 条件下培养细胞 24h。
21. 吸去纳米颗粒悬液，并加入等量的细胞培养液。随后，每隔一天换一次培养液，不再加入纳米颗粒。
22. 在合适时间裂解细胞以测量基因表达的水平。
    a. 用冷的 PBS 冲洗细胞两次。
    b. 在每孔中加入 0.1ml 1×细胞裂解液（CCLR）或 0.1%（*m*/*V*）Triton X-100 溶液。
    c. 37℃将 24 孔板在振荡培养箱中振荡 30min。
23. 检测细胞裂解液中基因表达的水平。如果用萤光素酶为标记基因，可以用萤光素酶底物通过化学萤光检测基因表达水平，同时用 BCA 蛋白质定量试剂测定蛋白质含量，以每毫克细胞蛋白质归一化萤光素酶的表达水平。

## 参考文献


Panyam J. and Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55:** 329–347.

Panyam J., Zhou W.Z., Prabha S., Sahoo S.K., and Labhasetwar V. 2002. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* **16:** 1217–1226.

Prabha S. and Labhasetwar V. 2004a. Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells. *Mol. Pharm.* **1:** 211–219.

———. 2004b. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm. Res.* **21:** 354–364.

Sahoo S.K., Panyam J., Prabha S., and Labhasetwar V. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* **82:** 105–114.

Vasir J.K. and Labhasetwar V. 2006 Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **3:** 325–344.

# 第五十七章　转座子介导的小干扰 RNA 传递："睡美人"转座子

Bradley S. Fletcher

Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, Florida 32610-0267 and Medical Research Service, Department of Veteran Affairs Medical Center, Gainesville, Florida 32610

王均　译



## 摘要

RNA 干扰（RNAi）已经成为对哺乳动物细胞进行基因操纵的有力工具。用病毒或非病毒载体可以构建稳定的 RNAi 输送系统。病毒载体相对有效，但需要使用病毒制备和转导的专业技术。非病毒载体的使用相对简单，但它依赖于对目标基因组的随机整合，效率低下，需要其他步骤分离基因表达充分下调的克隆。由胞内转录单位产生的短发夹状 RNA（shRNA）具备小干扰 RNA（siRNA）的功能，同样导致基因表达下调。这里我们介绍基于非病毒质粒，用"睡美人"（sleeping beauty，SB）转座子高效输送 pol III 驱动的 shRNA 表达框的方法。这一体系的优点包括它用标准的质粒转染试剂方便地进行基因输送，而且由于基因转位和多重整合的可能性使基因组整合效率增加，这样增强了 shRNA 的表达。因为该方法只需进行质粒 DNA 的转染，对病毒包装和转导没有任何要求。它的不足在于某些细胞难以被瞬时转染，而且在一些细胞中 SB 介导基因转位的活性不高。总的来说，转座子介导 siRNA 输送是一种在哺乳动物细胞中沉默靶基因的简单方法。

## 引言

RNA 干扰是一种通过双链小 RNA 分子序列特异性沉默基因表达的过程（McManus and Sharp 2002）。siRNA 通过生成 RNA 诱导沉默复合体（RISC）促进靶 RNA 序

列特异性降解并（或）抑制其表达（Tang 2005）。用化学合成双链小干扰 RNA 分子转染哺乳动物细胞，沉默特定基因的表达，是一种瞬时抑制基因表达的传统办法（Elbashir et al. 2001）。随着技术的进步，发展了从 RNA pol III 驱动的启动子（如 H1 或 U6）（Brummelkamp et al. 2002；Paddison et al. 2002；Paul et al. 2002）或巨细胞病毒（CMV）增强的 pol III 驱动的启动子（Xia et al. 2003）转录小发夹 RNA 的方法。转录后 Dicer 酶将 shRNA 剪切产生小干扰 RNA（Dykxhoorn et al. 2003）。这些方法以 DNA 为模板持续不断在细胞内合成小干扰 RNA 分子，提供了更多输送 pol III 驱动的转录单位的选择。最近 RNA 干扰领域取得的新进展使我们对 RISC 的一般和调节性功能有了更好的理解（Tang 2005）。通过结构分析对 RISC 的了解为目标位点选择提供了更可靠的工具，从而进一步增强了沉默基因表达的效率（Schwarz et al. 2003；Reynolds et al. 2004；Boese et al. 2005；Heale et al. 2005）。

大量不同的病毒载体和质粒 DNA 被用来输送 shRNA 到哺乳动物细胞。我们这里介绍用 *Tcl/mariner* DNA 转座子 SB 作为工具输送编码转录单位 shRNA 的方法。SB 转座子体系通过“剪-贴”机制将转座子随机插入到目标基因组的 TA 二核苷酸中。我们实验室研究出了一种转座子载体输送 RNAi，用于构建基因沉默的细胞株（Heggestad et al. 2004）。图 1 显示了这种转座子载体和 shRNA 剪切的实例。我们用类似的方法成功地在细胞培养中下调了 huntingtin 基因的表达（Chen et al. 2005）。此外，最近也有用 *Frog Prince*（FP）转座子的报道（Kaufman et al. 2005）。尽管这些方法目前仅局限于细胞培养中的应用，但是它们具有在动物模型中应用的潜力。

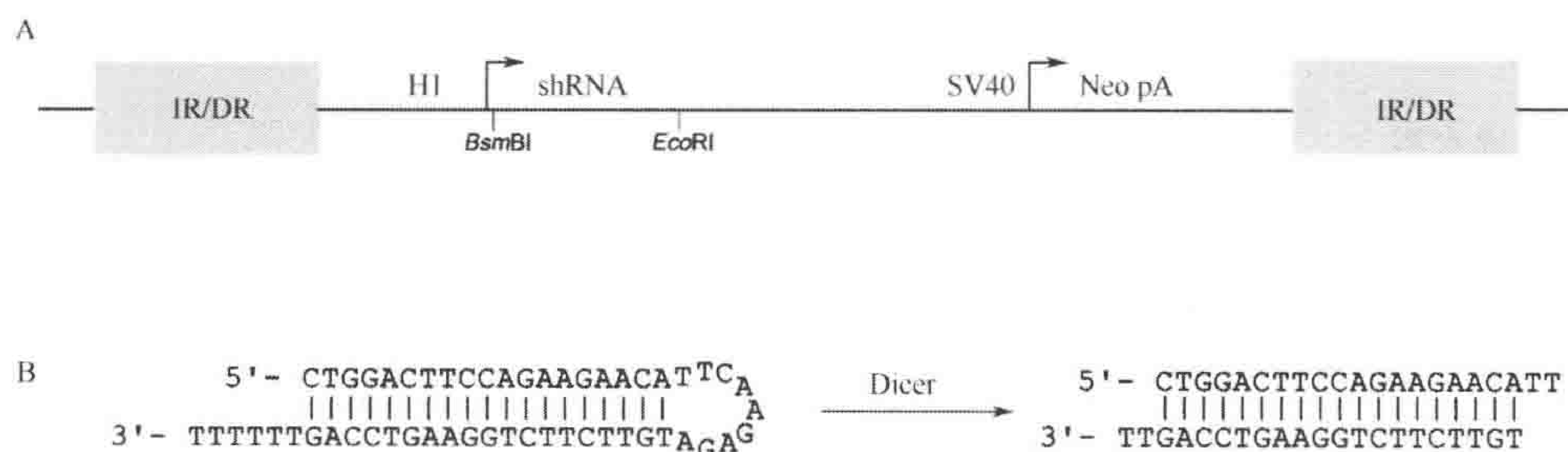



图 1. 质粒 pMaleficent 及 shRNA 示意图。A. 带 IR/DR 的转座子，含 H1 启动子驱动 shRNA 转录，以及 SV40 启动子驱动新霉素抗性基因转录；B. Dicer 剪切 lamin A-shRNA 前后示意图。

# 方案

## 转座子 siRNA 输送

以下描述用 SB 转座子体系输送 shRNA 实现基因沉默的方法。

### 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖凝胶（0.9%），根据标准方法制备

BGH 反向引物（5′-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3′）(Invitrogen)

转染试剂 LipofectAMINE Plus（Invitrogen）

NEBuffer 3（New England Biolabs）

编码目标基因 shRNA 的寡聚核苷酸

　　建议高效液相色谱纯化，5′端磷酸化（Operon Biotechnologies，Huntsville，Alabama）。

QIAEX II Gel Extraction Kit（QIAGEN）

QIAGEN Maxi Prep

限制酶：*Bsm*BI 和 *Eco*RI（New England Biolabs）

含驱动 shRNA 表达的 pol III 启动子的 SB 转座子质粒

　　pMaleficent（Heggestad et al. 2004）或 FP 体系 pFP/Neo-H1（Kaufman et al. 2005）。

SB 转座酶表达质粒 pCMV-SB10（Ivics et al. 1997）

　　也可使用其他高活性颠换突变子，如 pCMV-HSB17（Baus et al. 2005）、pCMV-HSB4（Yant et al. 2004）。如果用 FP，可使用表达质粒 pFV-FP（Kaufman et al. 2005）。

含 G418（0.5～1mg/ml）的培养基<!>

T4 DNA 连接酶（New England Biolabs）

瞬时转染的目标细胞株

### 仪器

沸水浴

组织培养板（10cm）

16℃、37℃和 55℃水浴

## 方法

### 寡核苷酸的合成

1. 设计针对目标基因的寡核苷酸对

　　文献中介绍了序列设计的方法（Schwarz et al. 2003；Reynolds et al. 2004；Boese et al. 2005；Heale et al. 2005）。也可从 OligoEngine(http://www.cerebre.com/index.html)或 Ambion(http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)获得在线帮助。至少合成三种不同序列的寡核苷酸，以及一个对照寡核苷酸对。

2. 对于 pMaleficent 载体，在 5′端和 3′端设计悬垂，与 *Bsm*BI 和 *Eco*RI 限制性连接位点相容，并且含合适的环结构和终止信号（Heggestad et al. 2004）。对于 FP 载体 pFP/Neo-H1，考虑 *Bgl*II 和 *Hin*dIII。

3. 寡核苷酸对（每 50pmol 溶于 50μl 蒸馏水中）经沸水浴复性处理 2min，缓慢冷却至室温（超过大约 20min ）。

## 连接到转座子

4. 37℃下，在 NEBuffer 3 中用约 20U 的 *Eco*RI 剪切转座子质粒 pMaleficent（2μg）1h（反应体积 20μl）。
5. 加入 10U *Bsm*BI 至上述反应管中，55℃培养 2h。
6. 用 0.9％的琼脂糖凝胶分离酶切产物，用 QIAEX II Gel Extraction Kit 纯化约 6kb 的剪切带。
7. 在 20μl 的反应中，用 T4 DNA 连接酶将琼脂糖凝胶纯化的载体（1μl 或 50ng）连接到复性处理的寡核苷酸（5μl）。
8. 细菌转化连接产物（约 3μl），挑取氨苄西林抗性菌落，用 BGH 反向引物 5′-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3′进行分析。
9. 确定正确的克隆后，对质粒进行大量扩增（QIAEN Maxi Prep）。

## 细胞转染

10. 用转染试剂 LipofectAMINE Plus 或其他高转染方法，将高品质质粒 DNA 转入目标细胞。
11. 建议 pMaleficent 和转座酶表达质粒的质量比为 4∶1。
12. 转染 2d 后，收集细胞并计数。将 $5\times10^3\sim1\times10^5$ 个细胞种在 10cm 的培养板上，用含 G418（0.5～1mg/ml）的培养基培养 14d，每 7 天换一次培养基。

    在培养板上种植细胞的数量取决于转染效率以及细胞内 SB 转位的活性。
13. 收集耐受性克隆，或分离单个耐受性克隆。冻存细胞，并通过蛋白质印迹技术或其他方法分析基因表达的下调。

## 参考文献


Baus J., Liu L., Heggestad A.D., Sanz S., and Fletcher B.S. 2005. Hyperactive transposase mutants of the *Sleeping Beauty* transposon. *Mol. Ther.* **12:** 1148–1156.

Boese Q., Leake D., Reynolds A., Read S., Scaringe S.A., Marshall W.S., and Khvorova A. 2005. Mechanistic insights aid computational short interfering RNA design. *Methods Enzymol.* **392:** 73–96.

Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. 2002. A system of stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296:** 550–552.

Chen Z.J., Kren B.T., Wong P.Y., Low W.C., and Steer C.J. 2005. *Sleeping Beauty*-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329:** 646–652.

Dykxhoorn D.M., Novina C.D., and Sharp P.A. 2003. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4:** 457–467.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411:** 494–429.

Heale B.S., Soifer H.S., Bowers C., and Rossi J.J. 2005. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res.* **33:** e30.

Heggestad A.D., Notterpek L., and Fletcher B.S. 2004. Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316:** 643–650.

Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., and Izsvák Z. 1997. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition into human cells. *Cell* **91:** 501–510.

Kaufman C.D., Izsvák Z., Katzer A., and Ivics Z. 2005. *Frog Prince* transposon-based RNAi vectors mediate efficient gene knockdown in human cells. *J. RNAi Gene Silenc.* **1:** 97–104.

McManus M.T. and Sharp P.A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **3:** 737–747.

Paddison P.J., Caudy A.A., and Hannon G.J. 2002. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 1443–1448.

Paul C.P., Good P.D., Winer I., and Engelke D.R. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* **29:** 505–508.

Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., and Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22:** 326–330.

Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., and Zamore P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115:** 199–208.

Tang G. 2005. siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* **30:** 106–114.

Xia X.G., Zhou H., Ding H., Affar el B., Shi Y., and Xu Z. 2003. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res.* **31:** e100.

Yant S.R., Park J., Huang Y., Mikkelsen J.G., and Kay M.A. 2004. Mutational analysis of the N-terminal DNA-binding domain of sleeping beauty transposase: Critical residues for DNA binding and hyperactivity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 9239–9247.

# 第五十八章　用展示 TAT 转导域的 λ 噬菌体来高效输送 DNA 进哺乳动物细胞

Jehangir Wadia，Akiko Eguchi 和 Steven F. Dowdy

Howard Hughes Medical Institute and Department of Cellular and Molecular Medicine，USD School of Medicine，La Jolla，California 92093-0686

王均和许严伟　译



## 摘要

将基因转移到细胞并表达新的蛋白质，或以此改变内源性蛋白质的表达水平，可以调节细胞的生理功能。这种方法对研究细胞功能十分有益，同时在大量疾病治疗方面具有良好的应用前景。因此，发展新型高效的非病毒 DNA 传输体系非常重要。最近发现被称为多肽/蛋白质转导域（PTD）的一些阳离子短肽能有效地将包括 DNA 在内的多种物质输送到各种细胞中。本章介绍表面提呈 HIV-1 TAT PTD 的 λ 噬菌体，它本身没有细胞毒性，但能以一种浓度依赖性的方式，有效地将质粒 DNA 输送进入大量不同的细胞。

## 引言

### 多肽/蛋白质转导域

PTD 是一类新型阳离子小肽，无论在体外还是体内都具有迅速转导进入所有细胞的能力，其效率接近 100%。它是受体非依赖性的，但却具有浓度依赖性（Dietz and Bahr 2004；Zorko and Langel 2005）。研究发现将 PTD 和包括蛋白质、寡核苷酸、小分子药物甚至 40nm 的铁纳米粒子在内的多种物质融合在一起，能直接造成这些物质在细胞内的积累，而观察不到明显的细胞毒性（Snyder and Dowdy 2005；Wadia and Dowdy 2005）。

HIV-1 TAT 蛋白 PTD 是其中的典型代表。TAT 蛋白是一种病毒性调节因子，它参与病毒长末端重复序列的反式激活，在病毒复制中扮演重要角色（Sodroski et al. 1985）。1988 年，两个研究小组分别独立地发现细胞外 TAT 蛋白可以进入细胞，并在培养细胞中反式激活病毒启动子（Frankel and Pabo 1988；Green and Loewenstein 1988）。在尝试提高融合蛋白的细胞摄取和活性的实验中，Vives 等发现足以引起细胞内在化的 TAT 蛋白短结构域（Vives et al. 1997）。他们从 TAT 的 37～60 位氨基酸开始，将 C 端或 N 端的氨基酸残基逐一切除，发现 TAT 的最小转导域位于其 47～57 位氨基酸（YGRKKRRQRRR）。自从发现 TAT 转导域之后，其他几种转导结构域也被陆续发现，其中包括 Antennapedia（Antp）（Perez et al. 1992；Fujimoto et al. 2000；Thoren et al. 2000）以及合成类肽聚精氨酸（poly-Arg）（Rothbard et al. 2002；Uemura et al. 2002；Wendr et al. 2002）。尽管没有证据显示这些蛋白质转导域的初级或二级结构具有同源性，但细胞内在化的效率却与这些蛋白质转导域的碱性氨基酸残基的数目密切相关。这一现象表明，可能存在一种依赖于蛋白质转导域的碱性残基正电荷和细胞表面磷脂（或带负电荷的蛋白多糖）相互作用的内吞机制（Wender et al. 2000；Futaki et al. 2001）。

不同的 PTD 具有促进细胞内在化的相同特征，但它们转导蛋白质进入细胞的能力具有一定程度的差别。尽管最近设计的肽序列如 TAT 的反义转型多肽（retro-inverso form）或聚精氨酸，似乎能成倍地增加细胞的摄取（Wender et al. 2000；Futaki et al. 2001），但到目前为止，TAT 融合蛋白在促进细胞内在化的表现明显上优于 Antp 融合蛋白。例如，Antp 虽然能将化学合成短肽转导进入细胞，但其转导大分子蛋白质分子的能力却显著降低（Kato et al. 1998；Chen et al. 1999）。这些现象表明，一定数目碱性氨基酸残基的存在，对输送大分子可能是必需的，这也许就是为什么 TAT 和 poly-Arg 能够广泛而且成功应用于癌症和中风治疗的临床前小鼠模型研究的重要原因（Wadia et al. 2004；Snyder and Dowdy 2005）。

## 细胞摄取机制

早期对 TAT 介导细胞摄取本质的观察依赖于显影，而且受细胞表面结合的强烈影响。随后，研究人员发现，将细胞固定后，胞外结合的 TAT 蛋白还是会重新分配到细胞质和细胞核（Lundberg and Johansson 2002；Vives et al. 2003）。为了确定 TAT 介导细胞内在化的机制，同时避免这一潜在的缺陷，Wadia 等（2004）用称为表型检测（phenotypic assay）的技术来研究其机制，实验中使用了融合 TAT 的 Cre 重组酶。在这个实验中，外源 TAT-Cre 融合蛋白必须进入细胞，定位于细胞核，并且在活细胞中以一种无毒方式切除转录终止序列（STOP）DNA 片段，才能观察到 GFP 的表达（Snyder and Dowdy 2005；Wadia and Dowdy 2005）。研究发现，用 TAT-Cre 处理指针 T 细胞，仅仅 15min 就足够使细胞重组群达到最大重组的一半，表明细胞对 TAT-Cre 摄取是一个快过程。进一步的实验将 proteoglycan 硫酸盐和 TAT-Cre 与细胞共同培养，发现内在化和重组都受到 proteoglycan 硫酸盐的负调节，这表明在内在化之前，TAT-Cre 和细胞膜表面带负电的膜成分之间的相互作用是必要的。

摄取胞外因子的内吞是一个重要的细胞过程（Conner and Schmid 2003）。早期仅

依赖于显影的研究表明，全长的 TAT 蛋白以及重组 TAT 融合蛋白的摄取都是通过内吞进行的（Silhol et al. 2002；Console et al. 2003；Fittipaldi et al. 2003；Lundberg et al. 2003）。相应地，荧光标记的 TAT-Cre 在活细胞内与内含体标记物也定位在一起。然而，当用多种降低胆固醇的试剂、内吞抑制剂以及显性负调控剂处理细胞时，发现 TAT 融合蛋白和多肽的内在化依赖于一个特殊的内吞通路，也就是脂质依赖性巨胞饮（图 1，见彩版）（Wadia et al. 2004）。而且，TAT 蛋白转化域锚定到细胞表面就足以刺激巨胞饮体的内吞。虽然巨胞饮体相对于其他类型内含体被认为是天生易漏的囊泡（Norbury et al. 1995；Meier et al. 2002），然而，观察用 TAT 蛋白处理达 24h 之久的细胞发现，绝大部分全长的 TAT 蛋白仍然滞留在巨胞饮体中，表明 TAT 从巨胞饮体释放到细胞质实际上是一个速率限制性过程。

图 1. TAT 介导蛋白质转导的机制。阳离子 PTD 促进巨胞饮，巨胞饮体 pH 降低，但不形成溶酶体。从巨胞饮体释放到细胞质是其速率限制性过程。

## 用展示 TAT 多肽的 λ 噬菌体输送 DNA

噬菌体外壳或衣壳蛋白可以和外源蛋白质表达为嵌合体而不丧失功能（Maruyama et al. 1994）。包装编码嵌合表面蛋白的 DNA 到噬菌体只需要噬菌体染色体 DNA 的一小段 DNA 片段表达即可。用这种办法，可以筛选大量多肽的生物学相互作用功能，而编码每个变量的遗传信息存在于噬菌体之内。丝状噬菌体、T7 和 λ 噬菌体均已被用作多肽展示系统，而在这些噬菌体中，λ 噬菌体作为 TAT 介导 DNA 输送体系有以下优点：首先，在 λ 噬菌体表面表达的外源性多肽更丰富，而其他噬菌体不是与 D-head 蛋白嵌合表达，就是与 majort tail V 蛋白嵌合表达，每个颗粒的拷贝数分别只有 420 和 200；其次，λ 噬菌体可以将大到 50kb 的双链 DNA 包装到致密蛋白质类外壳中，完全避免环境中核酸酶的降解；再次，DNA 包装到 λ 噬菌体可以完全在试管中操作；λ 噬菌体的最后一个优点是它非常适合大规模生产，而且由于其稳定性，很容易在极端条件下纯化。

为了构建 λ 噬菌体载体，将 TAT 转导域融合到噬菌体 D 蛋白的氨基末端，以容许它在噬菌体表面表达（图 2，见彩版）。在细菌中同时诱导溶源性噬菌体染色体的复制和 TAT-D 蛋白的生成就可以制备携带 TAT-D 蛋白的噬菌体颗粒（TAT-噬菌体）。用氯仿处理细菌后，在氯化铯平衡离心可以收获噬菌体颗粒。为了检测细胞摄取和 DNA

的表达，可以将携带蛍光素酶基因的重组 TAT-噬菌体颗粒和细胞培养 6h，48h 后测量蛍光素酶的活性。在所测试的细胞系中，裸 DNA 和野生型噬菌体没有导致任何蛍光素酶的表达。与之相反，TAT -噬菌体却诱导显著的报道基因表达（表 1）。由于 TAT 能结合到细胞表面，TAT -噬菌体促进基因表达可能是因为 TAT 增强了细胞膜对噬菌体颗粒的吸附。然而，表达高亲和性细胞膜结合配体的 RGD 噬菌体和低亲和性配体的 VN 噬菌体均不能转染细胞，显示 TAT 促进了细胞吞噬和胞内释放。用携带 GFP 基因的 TAT 噬菌体转染细胞，可以在荧光显微镜下原位观察 TAT 噬菌体介导基因输送的效率（Eguchi et al. 2001）。在 COS-1 细胞中 GFP 表达的效率随着 TAT -噬菌体的剂量增加而增加，用每细胞 $10^6$ 个和 $10^5$ 个噬菌体转染细胞，分别有 30%和 12%的细胞高表达 GFP 蛋白，而将细胞与 $10^6$ 个细胞剂量的野生型噬菌体培养，观察不到任何 GFP 的表达（图 3，见彩版）。

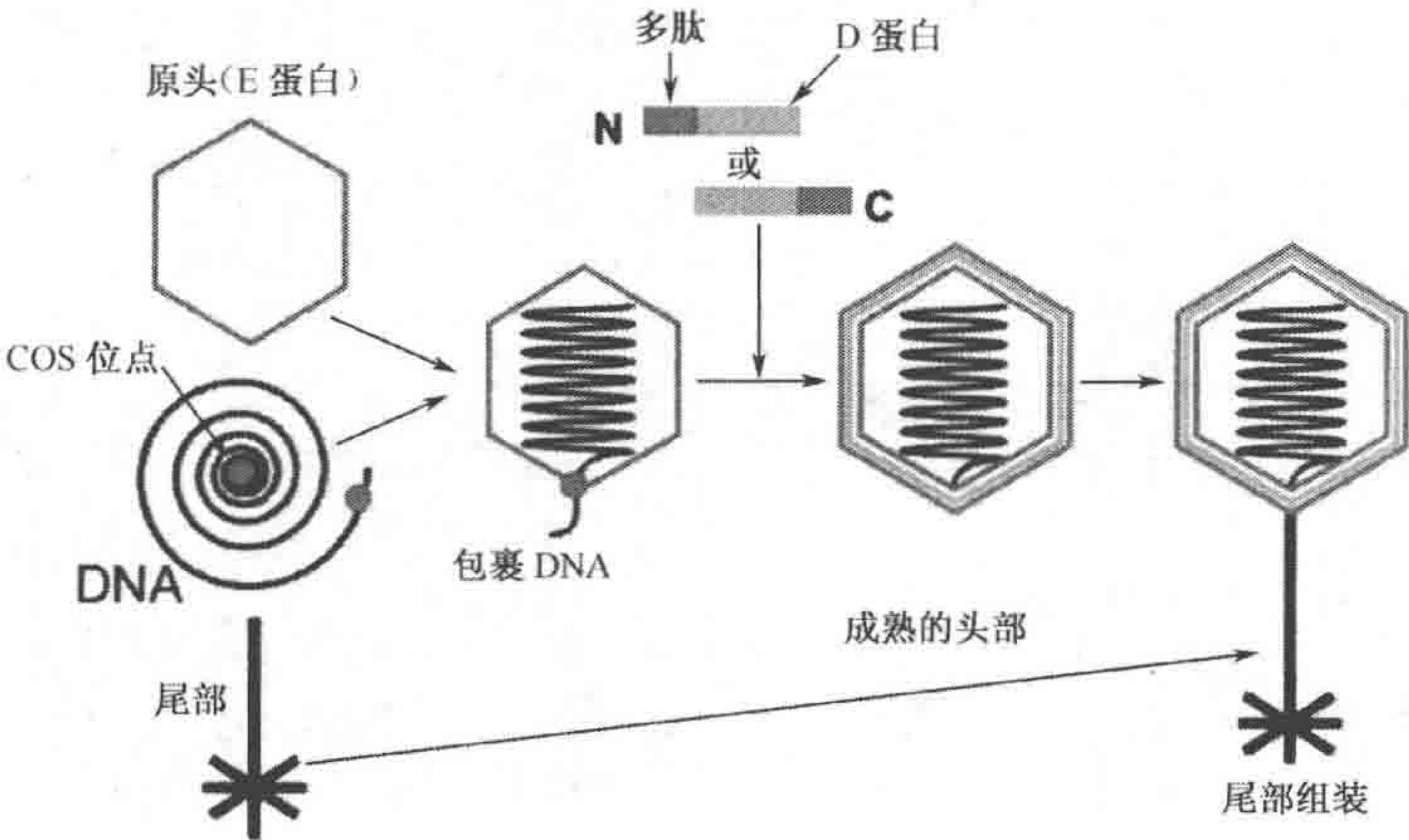



图 2. 制备展示外源多肽的 λ 噬菌体的过程。首先，通过 COS 位点的识别，DNA 被包装到含 E 蛋白的噬菌体原头（prohead），然后，带外源多肽的嵌合 D 蛋白组装到原头结构的表面。最后尾部和头部紧密结合。

**表 1. 不同重组噬菌体诱导标志基因的表达**

| 阶段 | 蛍光素酶的活性/(RLU/孔) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | COS-1 | VA13/2RA | 293 | NIH-3T3 | HeLa | A431 |
| Tat | 33 400±13 000 | 5590±1785.6 | 1820±1000 | 1660±642 | 282.2±97.7 | 56.7±10 |
| NLS | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| VN | <10 | n. d. | n. d. | <10 | <10 | n. d. |
| RGD | <10 | <10 | n. d. | <10 | <10 | n. d. |
| 野生型 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 裸露的 DNA | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |

在 37℃下，将细胞（$2.5\times10^4$个）在含 $2.5\times10^8$pfu 不同重组噬菌体或 10ng 纯化噬菌体染色体 DNA 的 500μg 培养基中培养 6h，然后用培养基洗涤细胞两次，继续培养 48h。按实验方法部分描述检测蛍光素酶的活力。RLU：相对荧光单位；n. d.：未测。

与其他非病毒基因载体类似，TAT-噬菌体需要和细胞培养 1h 或更长时间，以获得基因的高表达，而且基因的表达和培养时间（直到 6h）以及噬菌体剂量呈正比。此外和其他的体系相比，TAT-噬菌体还具有以下优点：①血清的存在不影响 TAT-噬菌

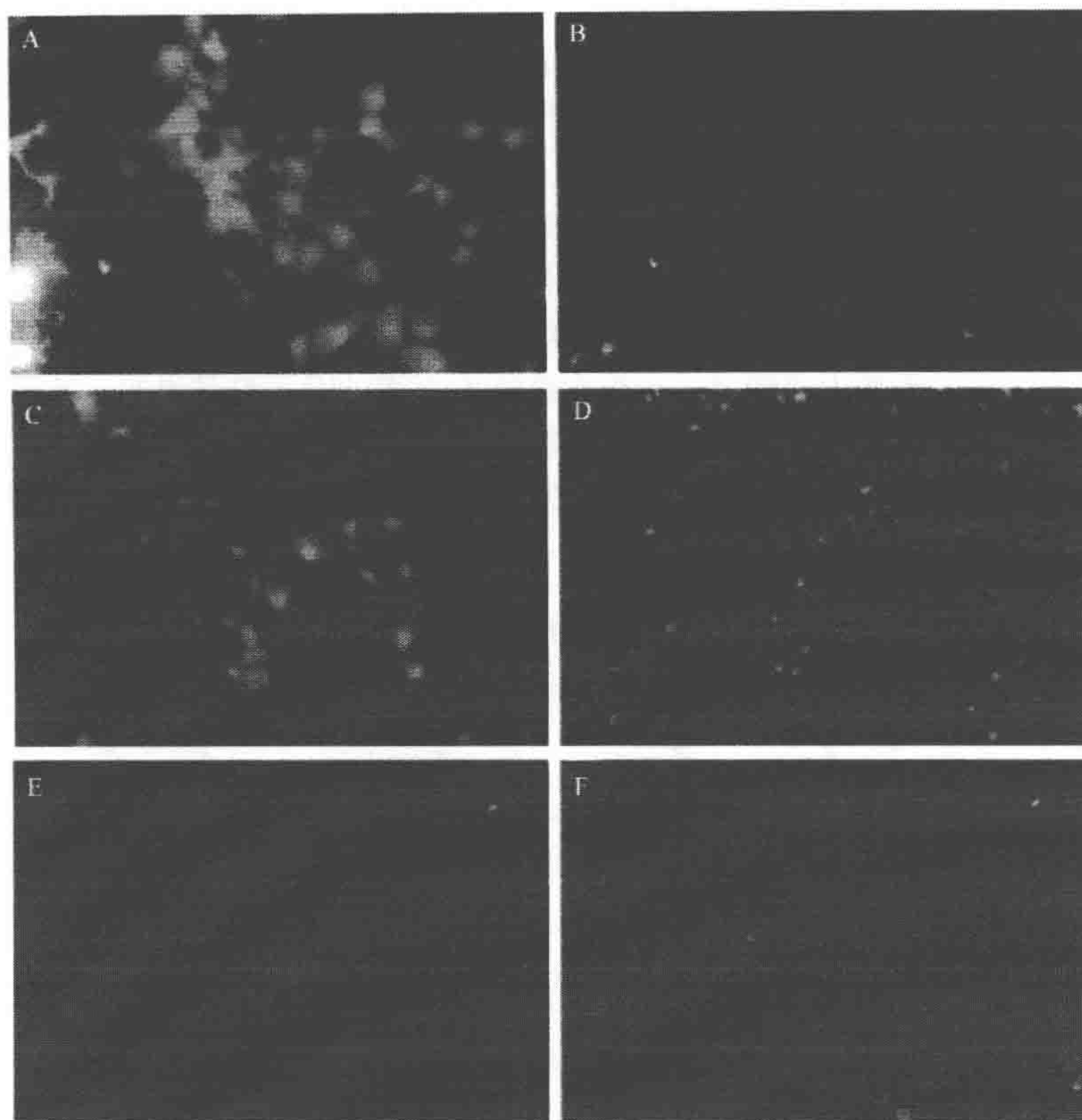



图 3. 在培养细胞中原位检测 TAT-噬菌体介导 GFP 基因表达的检测。在 37℃下，将 COS-1 细胞（$2.5\times10^4$）在 500μl 培养基中培养 6h，培养基中分别含 $2.5\times10^{10}$ pfu 的 TAT-噬菌体（GFP）（A、B），或 $2.5\times10^9$ pfu 的 TAT-噬菌体（GFP）（C、D），或 $2.5\times10^{10}$ pfu 的野生型噬菌体（GFP）（E、F）。48h 后，细胞用 DAPI 复染色，用荧光显微镜 GFPA 通道（A、C、E）或 WU 通道（B、D、F）观察。

体的效果；②噬菌体 DNA 包装在内部，不会被核酸酶降解；③用每细胞 $10^6$ 个噬菌体的剂量培养细胞 20h，观察不到明显的细胞毒性（Nakanishi et al. 2003）。总之，在 λ 噬菌体表面表达 TAT 蛋白转导域，能有效地将噬菌体输送到细胞内，并在大量细胞中表达基因而没有细胞毒性。

## 方案

# 用展示 TAT 转导域的 λ 噬菌体输送 DNA 到哺乳动物细胞

以下描述制备展示 TAT 多肽转导域的重组 λ 噬菌体的方法，以及用它输送质粒 DNA 到大量细胞的操作过程。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

细胞系：COS-1、293（购于 RIKEN Cell Bank，Wako，Saitama，Japan）、A431、NIH-3T3、W138/VA13/2RA（购于 the Health Science Research Resource Bank，Tokyo，Japan）和 HeLa

氯化铯<!>

氯仿<!>

DAPI（4′,6-diamidine-2-phenylindole HCl）<!>

DNaseI（Sigma-Aldrich）

H-SM 缓冲液（含 10mmol/L HEPES-NaOH 溶液、10mmol/L $MgSO_4$ 溶液<!>、100mmol/L NaCl 溶液，pH 7.5）

LE392 细胞

萤光素酶检测试剂盒（Promega）

Lysogenic *Escherichia coli*，λ D1180-GFP，或 D1180 萤光素酶

培养基

- DMEM 培养基，含 10%胎牛血清，用于 COS-1、293、A431、NIH-3T3 细胞培养
- MEM 培养基，含 10%胎牛血清，用于 WI38/VA13/2RA、HeLa 细胞培养
- LB 培养基，含 10g/L 胰蛋白胨（Becton Dickinson），5g/L 酵母提取液（Becton Dickinson），10g/L NaCl，10mmol/L $MgSO_4$<!>，10μg/ml 氨苄西林<!>

噬菌体染色体 DNA（10ng，纯化，$2.5\times10^8$ 个拷贝）

质粒：pTrc-D、pTrc-TAT-D、pTrc-RGD-D、pTrc-VN-D、pTrc-NLS-D，从 pTrcHi-sA 构建（Invitrogen）

噬菌体

- 不同类型的重组噬菌体（$2.5\times10^8$ pfu）
- TAT 噬菌体（$2.5\times10^8$ pfu 或 $2.5\times10^9$ pfu）
- 野生型噬菌体（$2.5\times10^{10}$ pfu）

### 仪器

透析袋

荧光显微镜

GFPA cube 和 WU cube（Olympus Optical Co. Ltd，Tokyo，Japan）

class chamber slide

32℃、37℃、38℃和 45℃的培养箱

24 孔板

## 方法

### 制备重组λ噬菌体

1. 32℃下，用 LB（含 10mmol/L $MgSO_4$、100μg/mL 氨苄西林）培养质粒转化的溶源性大肠杆菌，直到 $OD_{600}$ 的吸光值达到 0.3。
2. 45℃培养细菌 15min，然后 38℃培养 180min。
3. 用氯仿（终浓度 10%）和 DNase I（终浓度 10μg/ml）处理细菌，收获噬菌体颗粒。
4. 两轮氯化铯平衡离心分离噬菌体颗粒，然后在 H-SM 缓冲液中透析纯化。
5. 用 LE392 细胞作为宿主细胞，37℃下用空斑实验（plaque assay）测定滴度。

### 用重组噬菌体诱导标记基因的表达

6. 在 24 孔板中将待转染细胞以每孔 $2.5\times10^4$ 个细胞的密度接种，培养 12h。
7. 用培养基清洗细胞一次，用含 $2.5\times10^8$ pfu 重组噬菌体或 10ng 纯化噬菌体染色体 DNA 的 500μl 培养基在 37℃下培养细胞 6h。
8. 用培养基清洗细胞两次，继续培养 48h。
9. 收集细胞，用萤光素酶检测试剂盒定量分析萤光素酶的活性，用带标准差的平均相对荧光单位（RLU）表示结果。

### 在培养细胞中原位检测 TAT-噬菌体介导的 GFP 的表达

10. 以每孔 $2.5\times10^4$ 个的密度在 glass chamber slide 接种 COS-1 细胞，培养 12h。
11. 用培养基清洗细胞一次，然后用含 $2.5\times10^{10}$ pfu 或 $2.5\times10^9$ pfu 的 TAT 噬菌体，或 $2.5\times10^{10}$ pfu 的野生型噬菌体的 500μl 培养基在 37℃下培养细胞 6h。
12. 用培养基清洗细胞两次，继续培养 48h。
13. 收集细胞，用 DAPI 将细胞核染色，用荧光显微镜观察 GFP 的表达。

## 参考文献


Chen Y.N., Sharma S.K., Ramsey T.M., Jiang L., Martin M.S., Baker K., Adams P.D., Bair K.W., and Kaelin W.G., Jr. 1999. Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 4325–4329.

Conner S.D. and Schmid S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422:** 37-44.

Console S., Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R., and Ballmer-Hofer K. 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **278:** 35109–35114.

Dietz G.P. and Bahr M. 2004. Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach. *Mol. Cell. Neurosci.* **27:** 85–131.

Eguchi A., Akuta T., Okuyama H., Senda T., Yokoi H., Inokuchi H., Fujita S., Hayakawa T., Takeda K., Hasegawa M., and Nakanishi M. 2001. Protein transduction domain of HIV-1 TAT protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276:** 26204–26210.

Fittipaldi A., Ferrari A., Zoppe M., Arcangeli C., Pellegrini V., Beltram F., and Giacca M. 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 TAT fusion proteins. *J. Biol. Chem.* **278:** 34141–34149.

Frankel A. and Pabo C. 1988. Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55:** 1189–1193.

Fujimoto K., Hosotani R., Miyamoto Y., Doi R., Koshiba T., Otaka A., Fujii N., Beauchamp R.D., and Imamura M. 2000. Inhibition of pRb phosphorylation and cell cycle progression by an *antennapedia*-p16$^{INK4A}$ fusion peptide in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* **159:** 151–158.

Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., and Sugiura Y. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276:** 5836–5840.

Green M. and Loewenstein P. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT *trans*-activator protein. *Cell* **55:** 1179–1188.

Kato D., Miyazawa K., Ruas M., Starborg M., Wada I., Oka T., Sakai T., Peters G., and Hara E. 1998. Features of replicative senescence induced by direct addition of antennapedia-p16$^{INK4A}$ fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.* **427:** 203–208.

Lundberg M. and Johansson M. 2002. Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291:** 367–371.

Lundberg M., Wikstrom S., and Johansson M. 2003. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol. Ther.* **8:** 143–150.

Maruyama I.N., Maruyama H.I., and Brenner S. 1994. Lambda foo: A lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 8273–8277.

Meier O., Boucke K., Hammer S.V., Keller S., Stidwill R.P., Hemmi S., and Greber U.F. 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell Biol.* **158:** 1119–1131.

Nakanishi M., Eguchi A., Akuta T., Nagoshi E., Fujita S., Okabe J., Senda T., and Hasegawa M. 2003. Basic peptides as functional components of non-viral gene transfer vehicles. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4:** 141–150.

Norbury C.C., Hewlett L.J., Prescott A.R., Shastri N., and Watts C. 1995. Class I MHC presenTATion of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* **3:** 783–791.

Perez F., Joliot A., Bloch-Gallego E., Zahraoui A., Triller A., and Prochiantz A. 1992. Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide. *J. Cell Sci.* **102:** 717–722.

Rothbard J.B., Kreider E., VanDeusen C.L., Wright L., Wylie B.L., and Wender P.A. 2002. Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: Role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem.* **45:** 3612–3618.

Silhol M., Tyagi M., Giacca M., Lebleu B., and Vives E. 2002. Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 TAT-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to TAT. *Eur. J. Biochem.* **269:** 494–501.

Snyder E.L. and Dowdy S.F. 2005. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2:** 43–51.

Sodroski J., Patarca R., Rosen C., Wong-Staal F., and Haseltine W. 1985. Location of the *trans*-activating region on the genome of human T-cell lymphotrophic virus type III. *Science* **229:** 74–77.

Thoren P.E., Persson D., Karlsson M., and Norden B. 2000. The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers—The first direct observation. *FEBS Lett.* **482:** 265–268.

Uemura S., Rothbard J.B., Matsushita H., Tsao P.S., Fathman C.G., and Cooke J.P. 2002. Short polymers of arginine rapidly translocate into vascular cells. *Circ. J.* **66:** 1155–1160.

Vives E., Brodin P., and Lebleu B. 1997. A truncated HIV-1 TAT protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272:** 16010–16017.

Vives E., Richard J.P., Rispal C., and Lebleu B. 2003. TAT peptide internalization: Seeking the mechanism of entry. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4:** 125–132.

Wadia J.S and Dowdy S.F. 2005. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv. Drug Delivery Rev.* **57:** 579–596.

Wadia J.S., Stan R.V., and Dowdy S.F. 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **10:** 310–315.

Wender P.A., Rothbard J.B., Jessop T.C., Kreider E.L., and Wylie B.L. 2002. Oligocarbamate molecular transporters: Design, synthesis, and biological evaluation of a new class of transporters for drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **124:** 13382–13383.

Wender P.A., Mitchell D.J., Pattabiraman K., Pelkey E.T., Steinman L., and Rothbard J.B. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 13003–13008.

Zorko M. and Langel U. 2005. Cell-penetrating peptides: Mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **57:** 529–545.

# 第五十九章　细胞穿透肽介导的肽核酸寡聚体传送

Pontus Lundberg[*], Kalle Kilk[†] 和 Ülo Langel[*]

[*] Department of Neurochemistry, University of Stockholm, S-106 91 Stockholm, Sweden; [†] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tartu University, National and European Centre of Excellence of Molecular and Clinical Medicine, Ravila 19, 51014 Tartu, Estonia

赵建民和许严伟　译



## 摘要

特定位点的基因敲除和非病毒 DNA 传送技术在研究蛋白质功能中特别重要，同时也可以作为未来治疗的手段。很多技术的问题在于其生物相容性差和具有毒性，特别是在体内应用的时候。某些阳离子肽可以移位穿过细胞膜，更为重要的是它还可以携带比自身大数倍的"货物"，可以利用它们提高亲水大分子的生物相容性。这些阳离子肽（通常又被称为细胞穿透肽）可以用来运输很多种"货物"，包括基因调节寡聚核苷酸及其类似物，在体外和体内都能进行。肽核酸（PNA）是一种在蛋白质敲除中表现出巨大潜力的寡聚核苷酸类似物。它是一种类似于 DNA 的分子，相对于 DNA 来说，它与 DNA 和 RNA 的结合更为紧密，而且比它的 DNA 类似物更为稳定。并且参阅标准的肽合成实验指南可以很轻松地合成和修饰 PNA。

## 引言

PNA 是一种兼具肽和核苷酸性质的合成分子（图 1）（Nielsen et al. 1991，1994），核苷酸的磷酸糖苷部分被替换为氨基乙基甘氨酸（肽）骨架，可以用 t-Boc 或 Fmoc 固相肽合成方法进行合成（Awasthi and Nielsen 2002）。相对与普通寡核苷酸来说，PNA 增加的柔韧性和减少的负电荷使其与互补的 DNA 和 mRNA 结合更为紧密（Egholm et al. 1993；Giesen et al. 1998），也使得 PNA 不被核酸酶降解而更为稳定。上述的属性让

PNA 在反义研究（通过 mRNA 为靶标的寡核苷酸来敲除蛋白质）中成为一个极富魅力的工具。它的局限在于其生物相容性。在一些例子中，细胞穿透蛋白（CPP，有时也被称为蛋白质转导域）（Lundberg and Langel 2003）与 PNA 结合，增加了细胞对 PNA 的吸收效率。Pooga 等（1998）报道说，一段反义 PNA 通过二硫键与 CPP 相连，在体内和体外均可发挥作用。几乎同时，CPP-PNA 接合物被发现有生物活性（Aldrian-Herrada et al. 1998）。第二年，发现细胞核定位信号（NLS）-PNA 接合物可以增加寡核苷酸和质粒的传送效率。因为其中 PNA 与 DNA 的部分区域互补，这使得它们可以杂交并传送 DNA（Branden et al. 1999）。

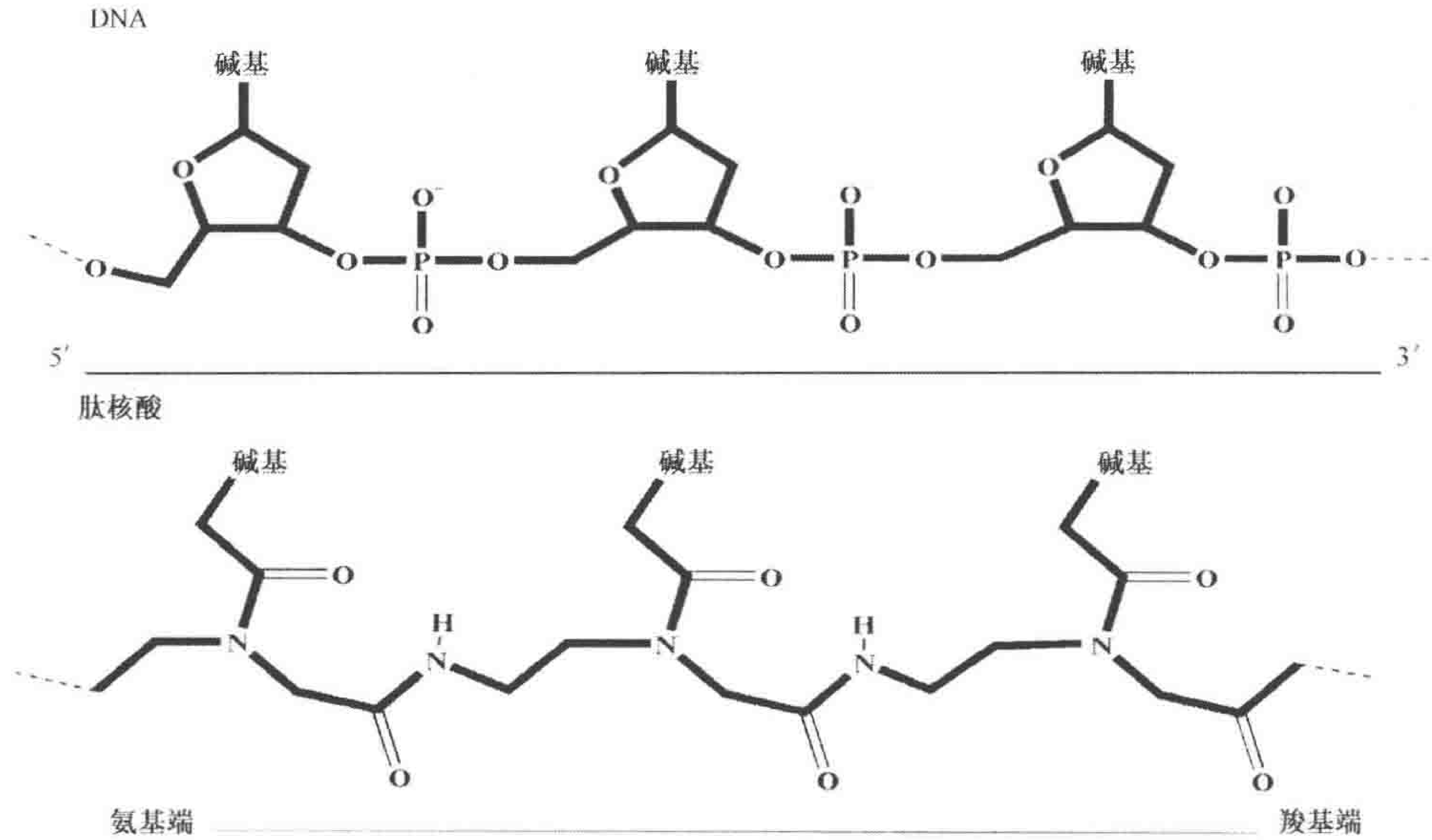



图 1. DNA 和 PNA 结构比较，其中碱基代表 4 种碱基之一。

还有一种相似的方法传送与 PNA 序列部分互补的 DNA 也是非常有效的，这段 DNA 可与 NF-κB 结合，阻止了由其介导的白细胞介素-1β 激活（Fisher et al. 2004）。相似的方法被用于 Myc 蛋白（El-Andaloussi et al. 2005）。构建和使用 CPP-PNA 接合物的不同策略总结在下面（表 1，图 2）。由于篇幅的限制，这里只介绍了二硫键与 CPP 结合的实验步骤，因为这是在很多 CPP-PNA 构建中都是重要而且复杂的一步。进一步了解 PNA 传送和其他核苷酸类似物的相关内容，请参考 P. Nielsen 和 M. Gait 组最近的综述文章（Koppelhus and Nielsen 2003；Zatsepin et al. 2005）。

**表 1. PNA 与肽连接的不同方法**

| 结合策略 | 细胞类型 | 靶标 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| CPP-S-S-PNA | 黑色素瘤细胞 | 神经节肽受体 1 | Pooga et al. 1998 |
| CPP-PNA | 原代老鼠神经细胞 | 前阿催产素原 | Aldrian-Herrada et al. 1998 |
| NLS-PNA | COS-7、3T3 和 HeLa | DNA 传送用 PNA | Branden et al. 1999 |
| CPP-S-S-NLS-PNA | 人类前列腺癌细胞 | — | Braun et al. 2002 |
| CPP-S-S-PNA-Decoy | Rinm5F | NF-κB（通过诱饵 DNA 的传送） | Fisher et al. 2004 |
| | | | El-Andaloussi et al. 2005 |

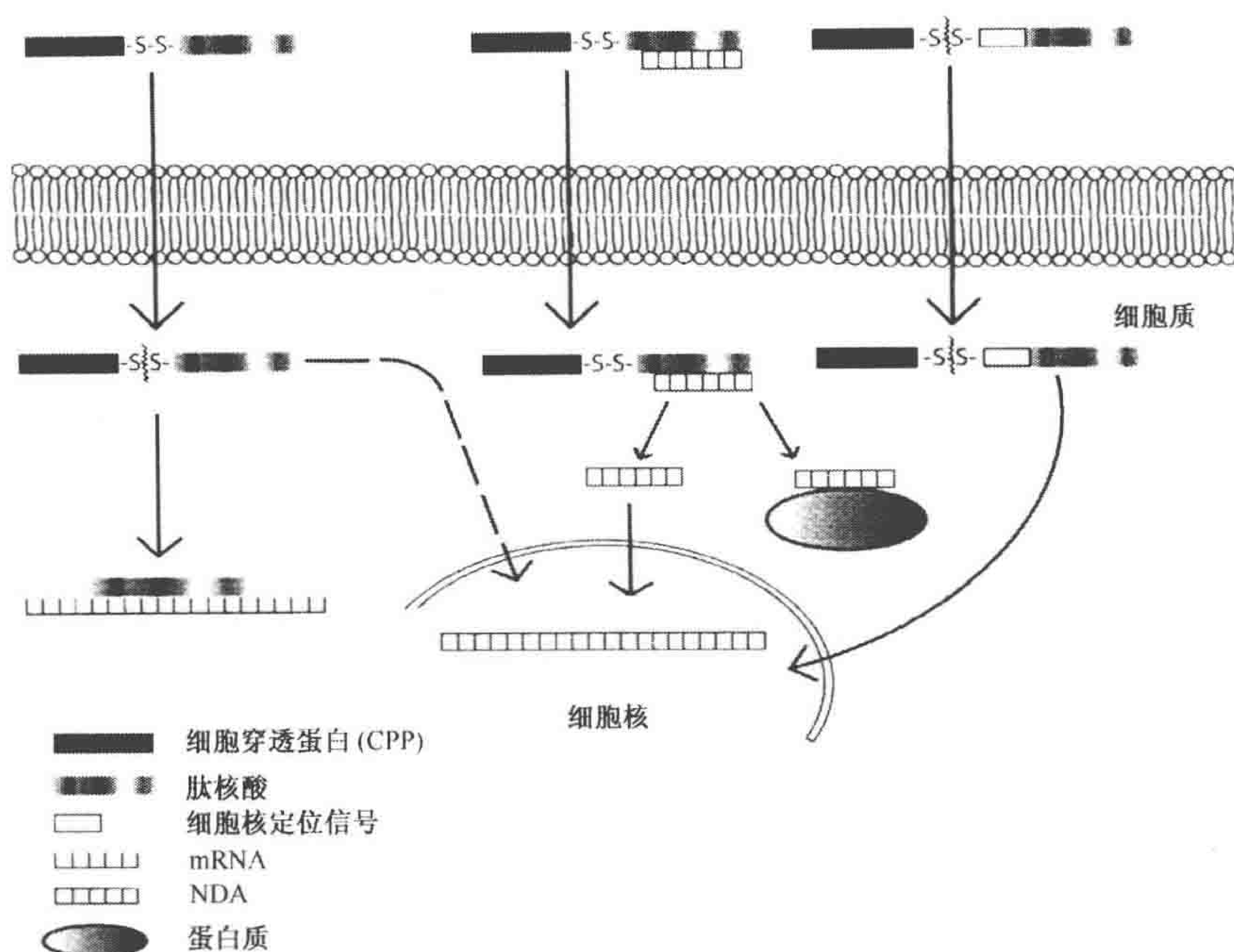



图 2. 以 CPP 为载体的 PNA 传送示意图。

# 方案

## 肽与 PNA 的接合（接合产物传送入细胞）

本指南中通过构建二硫键将细胞穿透蛋白与 PNA 共价结合在一起。由于其相对较高的效率和较低的毒性，该方案是对现有蛋白质敲除和 DNA 传送实验方法的改进和发展。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

乙酸-乙酸钠缓冲液（0.1mol/L，pH 5.5）

表达目的蛋白的细胞系（生长于 24 孔板中）

CPP-S-S-PNA 水溶液（0.1mmol/L），步骤 1～9 制备

CPP-S-S-杂乱控制 PNA（0.1mmol/L），步骤 1～9 制备

包含半胱氨酸的 PNA 或肽，其中之一必须有一个 3-硝基-2-嘧啶磺酸苯衍生半胱氨酸

二甲亚砜（DMSO，纯度大于 99.9%）< !>

二甲基甲酰胺（DMF，纯度大于 99.8%）<!>

反相高效液相色谱洗液 A：99.9% $H_2O$（HPLC 级）+0.1%TFA<!>

反相-HPLC 洗液 B：99.9%乙腈<!>（HPLC 级）+0.1%TFA<!>

相应细胞系的不含血清完全生长培养基

三氟乙酸（TFA）<!>（若没有 TFA 也可用 6mol/L 盐酸胍<!>或者 7mol/L 尿素<!>替代）

### 仪器

反相-HPLC C-18 柱（如 Supelco discovery 25cm×10mm×5μm）

目的蛋白冻干和定量的设备（如 Western blot 和放射配基结合法）

培养箱，预设 37℃

质谱仪

离心管（两个 1.5ml）

24 孔板

分光光度计

水浴锅，预设 55℃

## 方法

### 通过二硫键连接肽和 PNA

1. 称量 0.5～2mg 肽和 1mol PNA 分别装入不同的离心管中。
2. 用 200μl 去氧 DMSO 溶解 PNA。如果不能溶解，55℃温浴 5min，如果还没有溶解，可使用该悬浮液继续实验。
3. 在 100μ 10.01mol/L 乙酸缓冲液中溶解肽（pH 5.5）。
4. 在每个溶液中都加入 200μl DMF（推荐）或 DMSO。
5. 混合两个溶液并充分振荡。如果 PNA 仍然没有溶解，10 000*g*（桌面离心机的最大速度）离心 2min，吸取 5～30μl TFA 加入（取决于沉淀大小），20s 后振荡重悬。如果没有 TFA 可以用 6mol/L 盐酸胍或 7mol/L 尿素替代。

   另外，还可以将两个赖氨酸连接到羧基端和氨基端来提高 PNA 溶解度。这样二硫键形成可以在 0.01mol/L 乙酸缓冲液和乙腈溶液（50/50）中进行。
6. 室温振荡或搅拌 2h 或过夜。避免直接见光。
7. 半制备反相-HPLC 分离反应产物。
   a. 梯度取决于肽的疏水性。对于疏水蛋白，使用等度 20%洗液 B 5min，然后使用梯度增加到 100%的洗液 B 40min；

      富含精氨酸和赖氨酸的肽的 HPLC 曲线类似于 PNA 寡聚体，使得有效的分离很难。可以尝试从 0%洗液 B 60min 增加到 80%B。

   b. 检测波长为 218nm，肽带的最大吸收值为 260nm，指示 PNA 核酸碱基。使用 260nm 进行单一波长检测。
8. 收集吸收两个波长的色谱峰。

9. 冻干样品储存于－20℃暗处，避免反复冻融。应用质谱仪分析接合物确定正确的产物。

## 将 CPP-S-S-PNA 接合物传送到细胞中进行反义应用

10. 至少在实验前一天，接种表达目的蛋白的细胞系，使得实验当天细胞汇合度达到40%～60%。需要6个孔（两个平行反义实验，两个用于控制 PNA，两个对照不进行操作）。
11. 将培养基换为新鲜的无血清培养基。
12. 制备新鲜的 0.1mmol/L CPP-S-S-PNA 接合物或解冻一块以前制备的接合物（－20℃保存）。

    制备从 0.1mmol/L 到 5μmol/L 的一系列稀释液，估算低浓度下的反义效应。这需要比本实验中列出的更多的细胞和接合物。

13. 55℃加热 CPP-S-S-PNA 溶液 1min。
14. 在细胞培养孔中，每 1ml 培养基加入 10μl 0.1mmol/L 的 CPP-S-S-PNA 溶液，CPP-S-S-PNA 最终浓度为 1μmol/L。
15. 37℃培养 3h，然后换到完全培养基中。
16. 37℃培养至少靶标蛋白质半衰期的 2 倍时长。
17. 收集细胞，用适当方法测定蛋白质的量。

## 参考文献


Aldrian-Herrada G., Desarmenien M.G., Orcel H., Boissin-Agasse L., Mery J., Brugidou J., and Rabie A. 1998. A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons. *Nucleic Acids Res.* **26:** 4910–4916.

Awasthi S.K. and Neilsen P.E. 2002. Parallel synthesis of PNA-peptide conjugate libraries. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **5:** 253–259.

Brandén L.J., Mohamed A.J., and Smith C.I. 1999. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.* **17:** 784–787.

Braun K., Peschke P., Pipkorn R., Lampel S., Wachsmuth M., Waldeck W., Friedrich E., and Debus J. 2002. A biological transporter for the delivery of peptide nucleic acids (PNAs) to the nuclear compartment of living cells. *J. Mol. Biol.* **318:** 237–243.

Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., and Nielsen P.E. 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365:** 566–568.

El-Andaloussi S., Johanssen H., Magnusdottir A., Järver P., Lundberg P., and Langel Ü. 2005. TP10, a delivery vector for decoy oligonucleotides targeting the Myc protein. *J. Control Release* **110:** 189–201.

Fisher L., Soomets U., Cortes Toro V., Chilton L., Jiang Y., Langel Ü., and Iverfeldt K. 2004. Cellular delivery of a double-stranded oligonucleotide NFκB decoy by hybridization to complementary PNA linked to a cell-penetrating peptide. *Gene Ther.* **11:** 1264–1272.

Giesen U., Kleider W., Berding C., Geiger A., Orum H., and Nielsen P.E. 1998. A formula for thermal stability (Tm) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **26:** 5004–5006.

Koppelhus U. and Nielsen P.E. 2003. Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Adv. Drug Delivery Rev.* **55:** 267–280.

Lundberg P. and Langel Ü. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J. Mol. Recognit.* **16:** 227–233.

Nielsen P.E., Egholm M., and Buchardt O. 1994. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug. Chem.* **5:** 3–7.

Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., and Buchardt O. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254:** 1497–1500.

Pooga M., Soomets U., Hällbrink M., Valkna A., Saar K., Rezaei K., Kahl U., Hao J.X., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T., Bartfai T., and Langel Ü. 1998 Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* **16:** 857–861.

Zatsepin T.S., Turner J.J., Oretskaya T.S., and Gait M.J. 2005. Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents. *Curr. Pharm. Des.* **11:** 3639–3654.

# 第三篇　转基因表达的调控

# 第六十章　利用位点特异的 DNA 重组方法诱发基因组的条件突变

Kazuaki Ohtsubo 和 Jamey D. Marth

Department of Cellular and Molecular Medicine and the Howard Hughes Medical Institute University of California, San Diego, La Jolla, California 92093

时文涛　译



## 摘要

通过位点特异的 DNA 重组改变完整细胞和有机体的基因组已经成为一种重要的基因转移方法。基因转移和同源重组引起的 DNA 修饰一旦整合进目的基因组就不会再移动。与之相反，转移的 DNA 片段如果包含外源重组酶目的序列，则可以进一步修饰之前发生变化的基因组结构，从而提高了基因转移的实用性，加强了实验的设计。在动物模型中创造组织和细胞类型特异的遗传损伤，对祖先细胞进行不可消除的标记，诱导大规模染色体重排，在对表型维持和逆转的研究中补足基因缺陷，上述工作都可以通过在修饰过的基因组中直接表达重组酶来实现。而且，这种方法可以提供基因型 表型关系的数据以及被用于切除影响染色质结构和功能的标记基因。虽然一些早期工作使用了 Flp 重组酶，但大多数哺乳动物体系的研究则应用了从 P1 噬菌体中分离的 Cre 重组酶。以上两种酶都属于重组酶的整合酶家族，但结合不同的目的 DNA。Cre 重组酶作用于 34bp 的 *loxP* 位点，并像 Flp 一样进行保守的重组。我们在这里介绍了应用基因目的性方法将 *loxP* 位点引入载体和哺乳动物基因组的步骤以及接下来改变具有重组酶识别位点等位基因的方法。

## 引言

对细胞和机体完整基因组的修饰可以由多种 DNA 载体和基因转移策略完成。这种方法可以让我们对基因功能与控制个体发育、生理、疾病的生物学机制之间的关系有一个基本的认识。早期的基因转移技术被插入载体的 DNA 结构所限制，这导致对基因组不可逆的修饰，不能对基因组有效控制并进一步限制了实验的深入。与之相反，最近的新技术可以用来在细胞群体中切割或突变转移的 DNA 序列，这种技术在基因转移的技术发展和实验设计中是非常必要的工具，是通过应用位点特异的 DNA 重组酶及其底物实现的。现在许多应用了条件诱变技术的研究成果丰富了关于发育、生理、疾病发生过程中基因型 表型关系的知识。而且通过将表型与重组 DNA 连锁，这种技术可以产生精确控制的数据，允许遗传与生理间关系的明确分配，而应用以前的技术时很难确立这种关系，且在小规模或大规模体内基因诱变实验中不经常考虑这种关系。

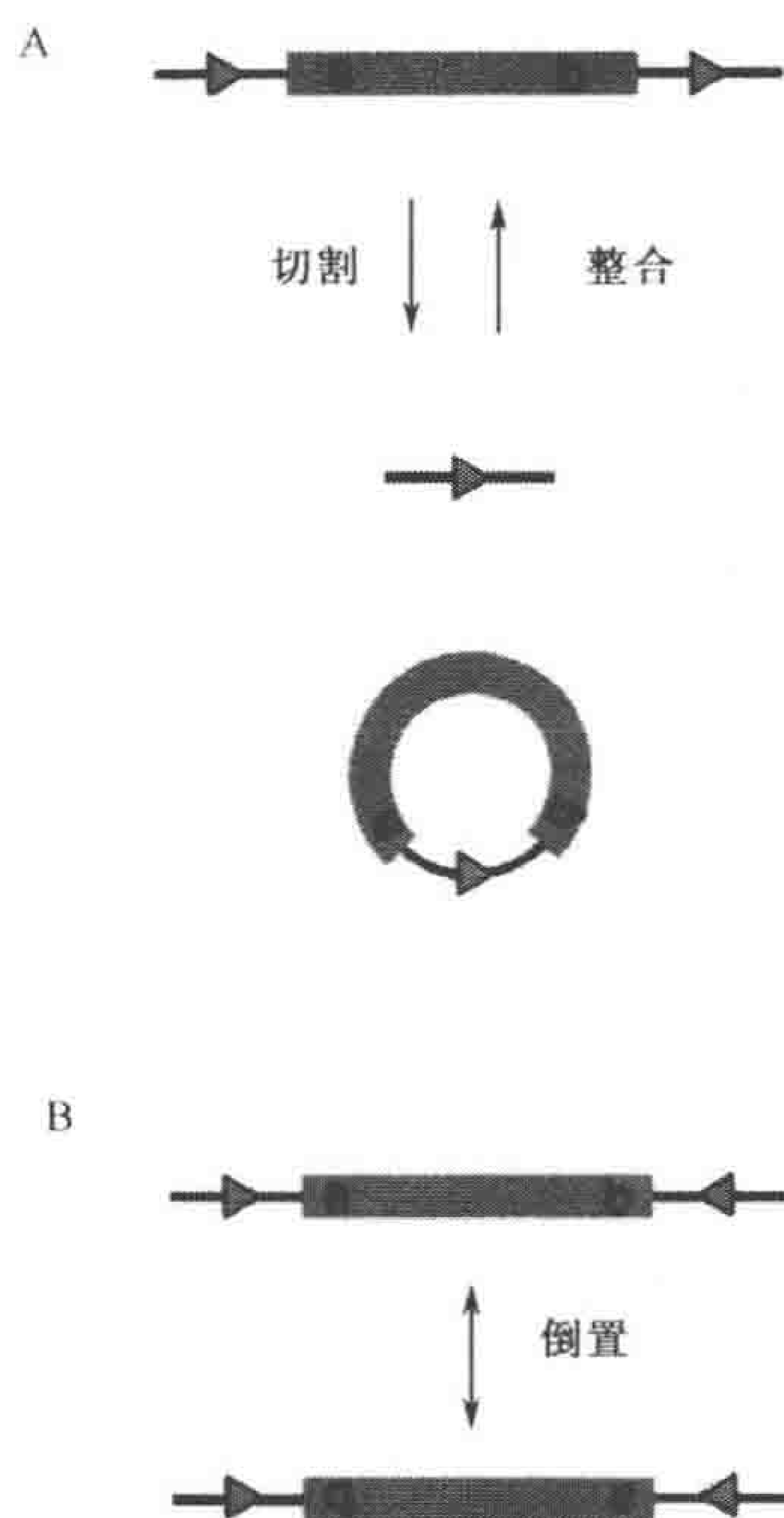



图 1. Cre-*loxP*重组。A. 位于正向重复的 *loxP* 位点之间的DNA可以被切割。这导致目的部位有一个残留的 *loxP* 位点，还产生一个被切割的含有 *loxP*位点的环状 DNA 结构。在完整细胞中，Cre 重组酶充足时，由于环状的染色体外产物会被降解，切割作用会占主体地位。B. 逆向重组反应。当存在 *loxP*位点反向重复时，也会引起位点特异性 DNA 整合。这个反应可以进行下去，重组基因组中 50%以上的 *loxP* 位点之间的 DNA 被颠倒过来。在 A 和 B 中，最终结果都依赖于所用 DNA 底物中 *loxP* 位点的方向和 Cre 重组酶的表达水平。

许多酶具有 DNA 重组活性。这些酶可以在几百万年的进化过程中从噬菌体到哺乳动物的多种机体中找到。包括位点特异重组酶的整合酶家族的这一类酶都是通过保守的 DNA 重组发挥作用的，酵母中分离的 Flp 重组酶和从噬菌体 P1 分离的 Cre 重组酶都是这个家族的成员（Abremski and Hoess 1984；Andrews et al. 1985），二者的作用机制基本相同（Hoess and Abremski 1990），且没有发现必需的辅助因子。Cre 重组酶依赖高能磷酸酪氨酸键中间体而不需要 ATP 和 DNA 拓扑异构酶，且可以在体外重组分离的 DNA。由于这些酶进行保守的 DNA 重组，所以在 DNA 链的切割、交换、分离过程中没有碱基的增加或丢失。

重组由重组酶与目的 DNA 序列结合开始（Cre 识别 *loxP* 位点，Flp 识别 *frt* 位点）。这些重组酶识别序列长 34bp，由两条 13bp 的重复序列和中间 8bp 的间隔区（spacer）组成，不对称的 8bp 间隔区使 *loxP* 位点具有方向性。间隔区序列的同一性对于 Holliday 接头中间体介导的重组是很重要的。位于两个正向重复的 *loxP* 位点之间的 DNA 可被切割，而在逆反应中被切割的 DNA 在重组酶存在时还可以

重新整合进目的序列，但是在完整的细胞中被切割的 DNA 很快就被降解，所以这种逆反应很少发生（图 1A）。反向重复的 *loxP* 位点使插入的 DNA 序列方向颠倒，这就产生了不同频率的非重组和反向插入 *loxP* 位点之间的 DNA（图 1B）。

Cre 和 Flp 重组酶都已被用于在异源基因组中基因转移后的 DNA 重组。在体外应用 Flp 重组酶的研究证明其在果蝇和哺乳动物细胞基因组中具有显著的重组酶活性（Golci and Lindquist 1989；O'Gorman et al. 1991）。Cre 重组酶在体外哺乳动物细胞基因转移研究中也可以发挥作用（Sauer and Henderson 1988）。但是，Cre 基因来源于原核生物，它不被期望像转基因鼠中转入基因那样高效表达，而且也不清楚胚胎初期的细胞是否支持 Cre 重组。所以当 Lakso 等发现转基因鼠胚胎多细胞支持噬菌体 Cre 表达和其重组活性时，让人们感到非常意外（Lakso et al. 1992；Orban et al. 1992）。Orban 等设计实验评价转基因 Cre 重组酶的重组效率，他们研究了重组酶活性对染色体位点的依赖性、插入 DNA 长度对酶活性的影响、在发育过程中关闭 Cre 表达后重组 DNA 结构在子代细胞中的遗传率，最后得出结论：Cre-*loxP* 重组可以用于创建组织特异性基因失活模型，可以用于测定细胞表型和像肿瘤这样疾病的维持在多大程度上依赖于转基因的活性，还可能用于促进异源染色体重组（Orban et al. 1992）。接下来将 *loxP* 位点放置在精确的遗传基因座证明了 Cre-*loxP* 重组对于更精确的哺乳动物基因功能研究来说确实是一种有效的新方法（Gu et al. 1994；Hennet et al. 1995；Ramirez-Solis et al. 1995；Smith et al. 1995；Marth 1996）。

位点特异性 DNA 重组的一个有用的特性是具有清除标记基因的能力，它们一般用于基因转移策略中的选择和筛选。这些染色体整合的标记基因顺反子（如新霉素磷酸转移酶）可以改变临近遗传基因座的活性，而这些临近的内源基因往往是我们在设计实验过程中需要考虑的因素（Fiering et al. 1993）。Cre 重组酶将 DNA 载体整合进含有单一 *loxP* 位点染色质中的能力提供了获得更多可再生基因表达的潜能（Fukushige and Sauer 1992）。在应用位点特异性重组介导的条件诱变的过程中，发展了很多新特征，包括用可诱导启动子控制 Cre 的表达和产生条件性亚等位基因（Kuhn et al. 1995；Logie and Stewart 1995；Metzger et al. 1995；Meyers et al. 1998）。通过 Cre 重组构建的在所有组织或细胞类型中表达 β-半乳糖苷酶的转基因小鼠，为测定内源启动子活性提供了一个更精确的途径（Mao et al. 1999；Soriano 1999）。另外，还可以通过 Cre-*loxP* 重组引起的条件诱变来研究 X 染色体上必需基因的功能（Shafi et al. 2000；O'Donnell et al. 2004）。在亲代配子中表达 Cre 重组酶可以对实验进行高水平控制，将观察到的表型与缺失的 *loxP* 位点之间的 DNA 连锁，因此就不需要建立由多个胚胎干细胞克隆形成的多个小鼠种系（Shafi et al. 2000）。

重组效率的高低对于实验设计是否适合于 Cre、Flp 或其他重组酶系统是十分重要的。在体内实验，Cre 重组酶的重组效率比 Flp 高很多。但在 37℃具有更高稳定性的 Flp 突变体提高了每单位 Flp 的重组效率（Bucholz et al. 1998）。由于从酵母中分离的原始 *frt* 序列的结构含有临近的第三个 *frt* 位点，而体外的重组并不需要这个位点，所以还不清楚原始 *frt* 序列结构在哺乳动物细胞中是否会降低 Flp 的重组效率（Senecoff et al. 1985）。Cre 重组的效率本身较高，还可以通过引入核定位信号和翻译起始保守信号对其进一步改进，有许多缺少这两种修饰或只具有其中一种修饰的 Cre 载体也被广泛地使用着，但很难鉴定出来。

在构建嵌合体细胞群时，应用 Flp 重组酶也是一个很好的选择。Flp 曾经被成功用于

亚等位基因构建并和 Cre 一起用于多层重组策略（Meyers et al. 1998；Soukharev et al. 1999；Nagy 2000）。在体内测定 Cre 重组效率，大多数研究都发现重组效率在不同细胞群体（包括遗传上相似的细胞）中有较大差异，应用 Cre 抗体和 DNA 重组标记基因研究发现这种差异是 Cre 入核的难易不同造成的。其他影响不同的 *loxP* 位点介导重组的因素还包括附近染色质的结构和 *loxP* 位点之间的碱基距离。事实上目的细胞群中的一部分并不表现 Cre 重组活性，即 *loxP* 位点之间的 DNA 没有被切割，根据实验的基本原理，这既有有利的一面，又有不利的一面：有利的一面是可以形成嵌合体细胞群从而提供一个实验系统，通过这个系统可以研究最近邻居效应（nearest-neighbor effect）的机制；不利的一面是如果目的细胞群体中重组频率太低则不会引起表型显著的改变（Nagy 2000）。

当缺乏 *loxP* 位点时，Cre 的表达可能对细胞的生活力有损害（Schmidt et al. 2000；de Alboran et al. 2001），但需要 Cre 表达水平异常的高。对具有不同表达方式和表达水平的 Cre 转基因鼠的研究结果证明，Cre 本身的表达不会引起表型改变，在导入 *loxP* 位点的细胞中也不会引起不正常的重组。还存在与野生型 *loxP* 位点相似但不完全相同的假 *loxP* 位点，这种假 *loxP* 位点的存在可能会引起重组（Sauer 1992），但这种重组非常少见而且一般是表型沉默的。上述结果表明，哺乳动物细胞基因组中仅存在一个野生型 *loxP* 位点的可能性也非常小。但是建立转入 Cre 的对照基因组对于我们得出可靠结论也是很必要的。

将 Cre 重组酶和 *loxP* 位点引入细胞和基因组的方法很多，可以根据实验设计进行选择，也不只局限应用于转基因鼠中。将 *loxP* 位点引入载体和基因组的方法可参考本书其他章节。虽然 Cre 可以重组大片段的 DNA，但它重组小片段时可以得到更高的重组率，实验观察到长至 10kb 的片段也具有较高的重组效率。*loxP* 位点之间 DNA 的结构（结构依赖于染色体定位、细胞类型以及载体构型）的不同限制了重组效率的可预测性。可以表达 Cre 的基因转移载体包括重组腺病毒、慢病毒、反转录病毒系统以及多种以质粒为基础的载体。应用何种基因转移系统由实验选择的目的细胞群决定，还应该考虑相关的细胞类型及完整的有机体。

将 Cre-*loxP* 重组方法掺入基因转移的实验设计是相对简单的。困难的是在实验过程中偶然遇到的一些步骤，特别是 *loxP* 位点的验证和 Cre 基因转移后多等位基因的获得。特殊的实验技术会在下面详细说明，以在 ES 细胞（胚胎干细胞）中通过同源重组获得载体插入序列的技术作为开始。Jackson 实验室保存了很多由不同实验室建立的 Cre 转基因鼠以及具有不同 *loxP* 位点间目的序列的小鼠种系，更多的信息请参见 http://www.mshri.on.ca/nagy/和 http://www.jax.org/resources/mouse_resources.html/。

## 方案 1

## 通过引入 *loxP* 转基因序列对基因组进行修饰

构建将 *loxP* 位点插入基因组的载体，如利用 pflox 载体通过同源重组将 3 个 *loxP* 位点引入目的转基因线性基因组（图 2A）。这里介绍了一个典型的创建条件性失活等位基因的方法，在这个方法中 *loxP* 位点的起始位置对等位基因的功能是没有影响的。但可以对 *loxP* 位点间的 DNA 序列进行点突变，突变后的序列可以被表达的 Cre 重组。必须考虑到可能产生截短的、序列发生变化或功能异常的等位基因。

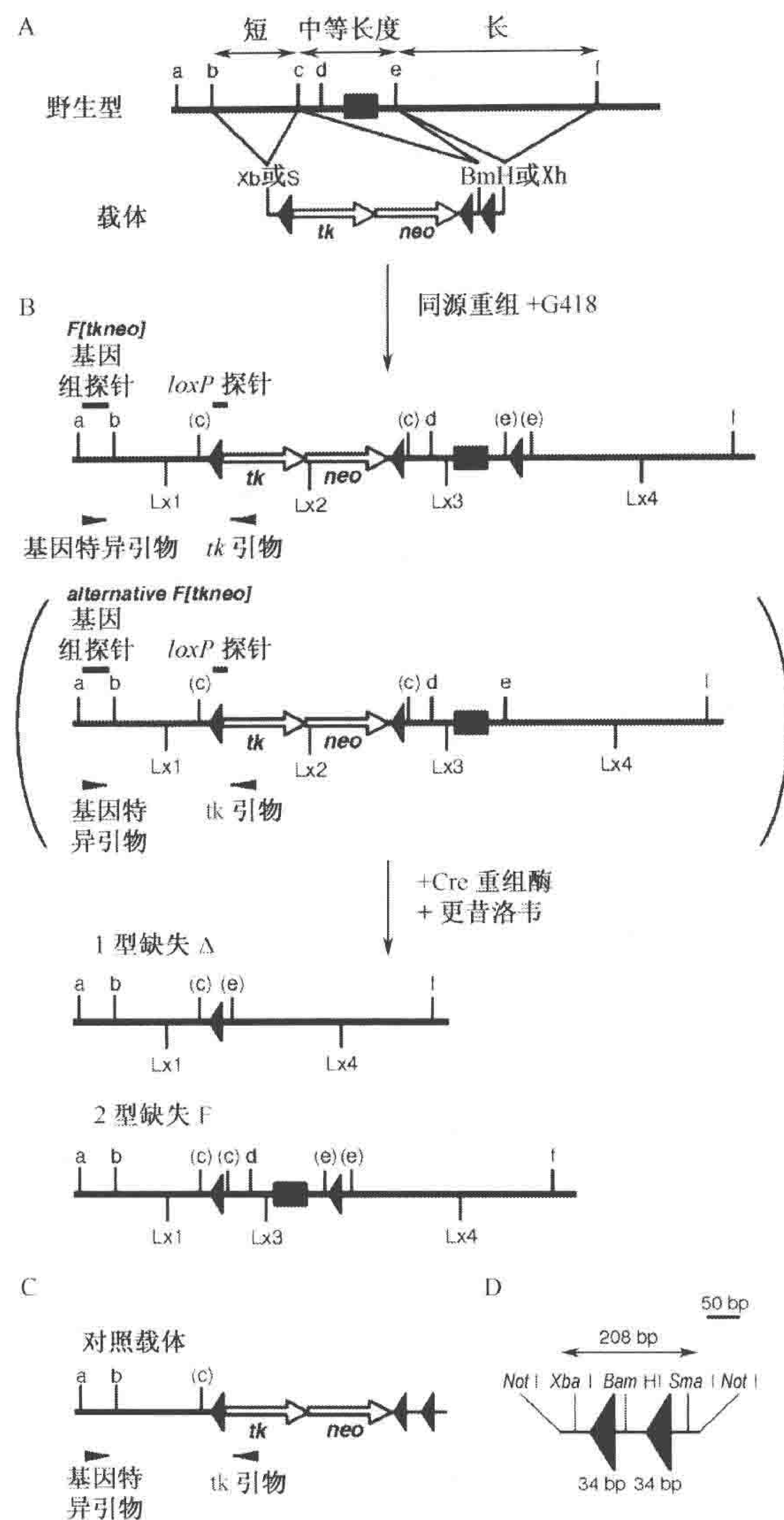



图 2. 通过引入 *loxP* 位点和 Cre 重组对基因组进行修饰。A. 目的载体是通过将 DNA 片段（短的、中等长度的、长的）插入到 pflox 载体中构建起来的。中等长度的片段中包含实验中所要删除的遗传序列或元件。黑色箭头表示 *loxP* 位点。pflox 载体中的限制性内切核酸酶位点：（Bm）*Bam*HI；（H）*Hind* III；（S）*Sal*I；（Xb）*Xba*I；（Xh）*Xho*I。（a～f）表示基因组 DNA 上特异的酶切位点；B. 载体通过同源重组整合进基因组，在胚胎干细胞中产生 *F*［*tkneo*］等位基因。*F*［*tkneo*］等位基因可以被 Cre 重组酶转变为 1 型（Δ）或 2 型（F）等位基因。大括号内是等位基因发生交换后的另一种结构，这种结构用 PCR 检测同源重组会产生阳性结果，这依赖于引物的位置；但这种结构的远端 *loxP* 位点丢失，使目的 DNA 序列不能被 Cre 重组。这种无用内部交换发生的频率是很低的，受染色质结构、*loxP* 位点间 DNA 片段的长度以及临近的短臂 DNA 片段长度的影响。小箭头标记的是用于筛选同源重组胚胎干细胞克隆 PCR 引物的位置。小括号标记的是在构建载体时破坏的酶切位点。应用一个与转入基因附近序列杂交的基因组探针进行 Southern 印记杂交，如可以选择与酶切位点（a～d）或 *loxP* 位点（Lx1～Lx4）杂交的探针；C. 对照载体的结构；D. 从 ploxP[2] 中分离的（如用 *Not*I 消化）*loxP* 位点探针的结构。

pflox 载体有两个并列的选择标记基因：新霉素磷酸转移酶基因（*neo*）和单纯疱疹病毒胸苷激酶基因（*tk*）。前者用于阳性筛选，可以筛选出含有亲代 3 型（type-3，含有 3 个 *loxP* 位点）等位基因 *F* [*tkneo*] 的克隆（图 2B）。后者用于接下来的阴性筛选，可以排除重组后还保留 *loxP* 位点之间 *neo-tk* 筛选标记的克隆。*tk* 基因可以被去除并且缺乏 *neo* 基因的重组体可以通过其他方法筛选，如 PCR。*tk* 基因必须在其存在于雄性种系之前被去除，否则会影响精子发生。缺乏标记基因的 *loxP* 位点之间的目的 DNA 序列命名为 F（floxed）或 2 型等位基因（type-2，含两个 *loxP* 位点），是精确控制的基因型（图 2B）。发生在距离最远的两个 *loxP* 位点之间的 Cre 重组产生 1 型（type-1）或（Δ）型等位基因（只含有一个 *loxP* 位点），这种类型 *loxP* 位点之间的目的 DNA 序列也会丢失（图 2B）。放置基因组 DNA 序列短臂和长臂的两种方向中的一种在图中被表示出来。长度为 4～12kb 的 DNA 序列的重组效率都比较高（te Riele et al. 1992）。当用 PCR 检测同源重组体时，将 1～2kb 的短臂作为扩增模板其灵敏度是最高的。在这一点上，构建一个含有部分整合结构的对照质粒是很有用的（图 2C）。接下来应用 *loxP* 探针可以很方便地在基因转移和 Cre 重组后对 *loxP* 位点是否存在及其位置进行分析，*loxP* 探针来源于 ploxP[2] 质粒（图 2D）。

## 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

电泳级琼脂糖

2×细胞冻存液（含 40% DMEM、40%胎牛血清、20% DMSO）

50×Denhardt 溶液

- 1g 聚蔗糖（Ficoll，Amersham Biosciences 17-0300-50）
- 1g 聚乙烯吡咯酮（Sigma-Aldrich P0930）<！>
- 1g 牛血清白蛋白（Calbiochem 126609）

溶解于 100ml 高压灭菌的水中。

硫酸葡聚糖（10%；Sigma- Aldrich D7037）

二甲基亚砜（DMSO；Sigma- Aldrich D2650）<！>

用于基因转移的 DNA 目的克隆：一般是 20kb 左右的同源基因组片段。

DMEM 培养基（GIBCO/Invitrogen 11960-044）

胚胎干细胞（ES）

学术和商业机构可以提供很多鼠 ES 细胞系，像 R1 种系（Nagy et al. 1993），不需要饲养细胞，当白血病抑制因子存在时，可以直接在凝胶化的培养皿中生长。

ES 细胞培养基

- 500ml DMEM
- 15%胎牛血清（94ml 储存液）
- 0.1mmol/L 非必需氨基酸（6.2ml 储存液）
- 1mmol/L 丙酮酸钠（6.2ml 储存液）

55μmol/L 2-巯基乙醇（620μl 储存液）

青霉素：链霉素：谷氨酰胺的混合液比例为 100U/ml：100U/ml：2mmol/L（6.2ml 储存液）<!>

1000U/ml LIF（ESGRO）（62μl 储存液）

乙醇（70%和 100%）<!>

胎牛血清（FBS；Hyclone SH30070.03）

G418（200mg/ml；GIBCO/Invitrogen 11811-031）<!>

凝胶（0.1%）

将 0.5g 凝胶（Type A，从猪皮中分离；Sigma-Aldrich G2500）溶解于 500ml 组织培养级水中；高压灭菌。

杂交缓冲液

35%甲酰胺<!>

4×SSC

25mmol/L $NaH_2PO_4$

10%硫酸葡聚糖

4×Denhardt 溶液

100mg/ml 鲑鱼精子 DNA

0.15×SET

杂交洗液

5ml 20×SSC

1g SDS 十二烷基肌氨酸钠

1L 水

白血病抑制因子（LIF；$10^7$ U/ml）（ESGRO，Chemicon ESG1107）

裂解缓冲液

10μmol/L Tris-HCl（pH7.5）<!>

10μmol/L EDTA

10μmol/L NaCl

0.5%十二烷基肌氨酸钠

1mg/ml 的蛋白酶 K <!>

MEM 非必需氨基酸（10mmol/L；GIBCO/Invitrogen 11140-050）

2-巯基乙醇（储存液为 55mmol/L；GIBCO/Invitrogen 21985-023）<!>

矿物油（Sigma-Aldrich M8410）

NaCl-乙醇<!>

将 3ml 5mol/L 的 NaCl 溶解于 100ml 100%的乙醇。

$NaH_2PO_4$（1mol/L）<!>

将 1.7g 二元磷酸盐（Sigma-Aldrich S9390）和 10.56g 一元磷酸盐（J. T. Baker 4011-01）溶解于 100ml 水中。

寡核苷酸

基因特异性引物（必须从感兴趣的目的等位基因选择）

TK 特异性引物（5′-TTCGAATTCGCCAATGACAAGACGCTG-3′）
PCR 试剂盒（Takara Ex Taq polymerase；TAKARA，TAKRR001）
青霉素：链霉素：谷氨酰胺的混合液（比例为 10 000U/ml：10 000U/ml：200mmol/L）（GIBCO/Invitrogen 10378-016）<!>
磷酸盐缓冲液（PBS；GIBCO/Invitrogen 14190-144）
质粒 DNA
pflox 载体（Chui et al. 1997）
ploxP$^2$（用 *Not*I 酶切得到含 *loxP* 位点的探针）（Chui et al. 1997）
用此方法也可以便利地构建其他质粒，只要酶切片段包含周围的基因组片段以及目标靶基因序列。这些质粒可用于检测同源重组前后以及 Cre 酶介导的重组后的等位基因结构。
预杂交缓冲液
6×SSC
20mmol/L $NaH_2PO_4$
0.4% SDS
5×Denhart 溶液
100μg/ml 鲑鱼精子 DNA
蛋白酶 K（1mg/ml；Sigma- Aldrich P6556）
鲑鱼精子 DNA（Sigma- Aldrich D1626）
1×SET
10mmol/L Tris-HCl（pH7.5）
5mmol/L EDTA
1% SDS
丙酮酸钠（100mmol/L；GIBCO/Invitrogen 11360-070）
20×SSC
将 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠<!>溶解于 1L 水中，调 pH 至 7.0。
TE 缓冲液
10mmol/L Tris-HCl（pH7.5）
1mmol/L EDTA
胰酶-EDTA（0.05%；GIBCO/Invitrogen 25300-054）<!>

## 仪器

细胞电击管（Gene pulser cuvette，0.4cm 电极间隙；Bio-Rad 165-2088 或同级别的仪器）
电转化仪（Gene Pulser II 和 Capacitance Extender；Bio-Rad）
细胞计数器
杂交箱（Model 400 H.I.；Robbins Scientific）
细胞培养箱（37℃，5% $CO_2$）
倒置显微镜
尼龙膜（Hybond N$^+$；Amersham RPN303B）

PCR 仪（GeneAmp PCR System 2700，Applied Biosystems）

PCR 管（200μl；Applied Biosystems）

微量移液器（P20 和 P200 Pipetman）

培养皿风口纸（Seal Plate；Excel scientific STR-SEAL-PLT）

泡沫塑料盒（大小可以装下 96 孔板）

组织培养皿（凝胶化的）

用 3ml 明胶溶液在室温下凝胶化培养皿（10cm，NUNCLON Δ Surface；NUNC 172958）1h，弃掉多余的溶液。

组织培养板（96 孔，平底，凝胶化）

50μl 明胶溶液凝胶化 1h，吸出多余的溶液。

组织培养板（96 孔，U 形底）（NUNCLON Δ Surface；NUNC 163320）

37℃和 55℃水浴

X 射线片（BioMax MS；Kodak 8294985）

## 方法

### 制备和鉴定 DNA

可以扩展 *F*［*tkneo*］目的载体的边界构建一个对照载体，从而使检测重组所用 PCR 引物被包括在内。

1. 用合适的限制酶内切核酸酶消化的基因组/转基因克隆，得到我们感兴趣的 DNA 片段。
2. 将 DNA 片段插入 pflox 载体的限制酶酶切位点，如果需要还可以采用平末端连接。

   *Xba*I 和（或）*Sal*I 用于短臂的插入，*Bam*HI 用于中等长度臂的插入，*Hind*III 和（或）*Xho*I 用于长臂的插入（图 2A）。
3. 用合适的限制性内切核酸酶（如 *Not*I）切割载体成线性。
4. 琼脂糖电泳鉴定质粒的浓度和质量。
5. 将分离的线性载体储存在无核酸酶的 TE 缓冲液中。

### 胚胎干细胞的培养和电转化介导的基因转移

6. 在凝胶化的组织培养皿上复苏并培养 R1 或类似的胚胎干细胞。

   每天更换培养液直到汇合度达到 70%。
7. 在电转化前 4h 更换培养液。
8. 用 PBS 洗细胞，加入 1ml 胰酶-EDTA，37℃孵育 5min。
9. 轻轻振荡使细胞从培养皿上脱落；加入 9ml 培养液，轻轻吹打细胞，吹散细胞团，使细胞重悬。
10. 细胞悬液转入一个 50ml 的离心管，190*g* 离心 5min。
11. 吸出上清，将细胞重悬于 30ml 灭菌的冷 PBS 中。
12. 用细胞计数器计算细胞的数量。
13. 190*g* 离心 5min；吸出上清，将细胞重悬于灭菌的冷 PBS 中使细胞浓度达到每

800μl 悬液中含 $10^7$ 个细胞。

14. 将细胞悬液转入一个灭菌的细胞电击管中，与 10μg 线性的载体混合；冰浴 10min。
15. 将电转化仪设置到如下参数：电压 240V，电容 500μF。将细胞电击管的电极面向连接器放置，传送电脉冲。
16. 将细胞电击管放在冰上孵育 10min。
17. 将细胞稀释成不同浓度（每个培养皿 $0.5\times10^6$～$2\times10^6$ 个细胞），培养 24h。
18. 为了进行阳性筛选，换成含 200μg/ml G418 的培养液进行培养。

    1～2d 更换一次培养液，直到 G418 抗性克隆长到 2mm 左右，一般需要 7～10d。

19. 准备凝胶化的平底 96 孔板，向每孔加入 150μl 含 G418 的培养液；准备每孔含 70μl 胰酶-EDTA 的 U 形底 96 孔板。
20. 将含有克隆的培养皿中的培养液换成 PBS；将培养皿置于倒置显微镜下。
21. 将 20μl 的移液器设置为 10μl，吸取一个 G418 抗性的克隆，转移到含胰酶的 96 孔板中。
22. 为另外的培养、冻存及制备 DNA 准备细胞。

    为了避免冻存细胞的步骤，PCR 检测必须用很少的细胞完成，还必须在原始平板（master plate）中细胞融合前完成。

**在原始平板中冻存细胞的步骤**

a. 用 200μl 移液器在约 80μl 胰酶-EDTA 溶液中轻轻重悬细胞；将 50μl 的细胞悬液转到一个 96 孔板中［用于细胞培养和（或）冰冻的原始平板］；将剩余的约 30μl 含胰酶-EDTA 的细胞悬液转入凝胶化的平底 96 孔板中（用于制备 DNA 的复制平板，见后面），并加入 150μl 培养液；将原始平板和复制平板都放回培养箱中。

b. 在含 G418 的培养液中培养细胞 3～5d。

   这时原始平板中的大部分克隆可以冻存；继续培养复制平板中的细胞直到可以得到最高的 DNA 产量，作为 PCR 的模板。

c. 用灭菌 PBS 洗孔 2 次。

d. 加入 50μl 胰酶-EDTA，37℃孵育 5min。

e. 加入 50μl 冰冷的 2×冻存液，用移液器轻轻吹打以重悬细胞。

f. 加入 100μl 冰冷的矿物油。

g. 用封口膜封住 96 孔板，放入泡沫箱中，移入－80℃冰箱。

**从复制平板中制备 DNA 的步骤**

a. 用 PBS 洗复制平板，加入 50μl 的裂解缓冲液。

b. 密封平板，55℃孵育 2～3h。

c. 加入 150μl NaCl-乙醇溶液；室温孵育 30min。

d. 慢慢倾斜平板以倒出上清，或离心平板后轻轻吸出上清。

e. 用 200μl 70%的乙醇洗孔 3 次，在实验台上干燥 DNA。

f. 向每孔加入 30μl TE 缓冲液，密封平板，37℃孵育过夜。

**不冻存原始平板细胞，直接通过 PCR 筛选的步骤**

当对照载体 PCR 检测的灵敏度足够高时，再检测目的克隆。

a. 用 200μl 的移液器轻轻吹打含有胰酶-EDTA 的复制平板中的细胞。

b. 将细胞悬液转入一个无菌的 15ml 锥形离心管中，离心管中至少含有 5ml 的细胞培养液。

c. 离心使细胞沉淀，吸出培养液。

d. 用 500μl PBS 洗细胞，将细胞转入一个 1.5ml 离心管，离心使细胞沉淀；吸出 PBS。

e. 将细胞重悬于 200μl 高压过的双蒸水中，并马上放在干冰上。

f. 煮沸 5min，短暂离心以去除管壁上的水滴。

g. 加入 50μl 蛋白酶 K，55℃孵育至少 5h（或孵育过夜）。

h. 煮沸 5min 以使蛋白酶 K 失活。

23. 将 20μl 用于 PCR 检测。

24. 培养 PCR 阳性克隆，使细胞增殖。

25. 通过基因组 Southern 杂交分析克隆的 *loxP* 位点。

对于 *loxP* 的基因组 Southern 杂交分析，选取一个或多个不包含于质粒 DNA 序列中的探针，同时选用 *loxP* 探针（如分离的 *Not*I 酶切片段；见图 2D）进行基因转染，以探测所有的 *loxP* 位点的存在。作为替代方法也可以选择能够区别于等位基因片段的基因载体的限制酶酶切片段。

## 方案 2

## 体外 Cre 重组酶基因的转移和 *loxP* 位点依赖性重组的检测

含有 *F* [*tkneo*] 等位基因的正确的胚胎干细胞克隆（就像在方案 1 中建立的）被转入 Cre 基因，可以产生含有 1 型（Δ）或 2 型（F）等位基因的亚克隆。Cre 的表达当然也会产生完全不同的 2 型（含两个 *loxP* 位点）等位基因，*loxP* 位点间的 *tkneo* 标记基因仍保留其中，但这样的亚克隆会被更昔洛韦的阴性筛选作用所排除。显然，Cre 重组酶的表达水平和其持续时间决定了具有更昔洛韦抗性的克隆中包含 1 型和 2 型等位基因结构的频率。有时会遇到的一个问题是出现缺乏 *loxP* 位点的野生型胚胎干细胞（这种细胞具有遗传性更昔洛韦抗性）。这些野生型细胞是由不完全筛选造成的，它们在最初基因转移和选择后没有被载体转导，即使存在，也只占所有分离克隆的一小部分。选择含有 2 型等位基因且 *tkneo* 基因缺失的亚克隆作为亲代细胞对于接下来 Cre 在其子代细胞中的重组是最好的。这可以有效地控制胚胎干细胞基因组中的自发突变，将基因型（*loxP* 位点间序列的缺失）与表型连锁起来，因此就不需要多种独立的胚胎干细胞克隆和小鼠种系。这里应用了包含 2 型等位基因的 ES 细胞来产生嵌合体小鼠，接下来与表达 Cre 的小鼠（如 ZP3-Cre 转基因鼠）杂交（Shafi et al. 2000）。接下来喂养小鼠的 2～3 个月的时间就不会像维持多克隆衍生出的小鼠那么麻烦了。另外一个有时会遇到的问题是在 Cre 电转化和更昔洛韦筛选之后会产生不含 2 型等位基因而含有 1 型等位基因的克隆。当减少电转化时 Cre 载体的用量到原来的 1/10～1/100 时，这种问题会有所缓解。另外，缺乏核定位信号和真核翻译保守模体的 Cre 变异体也可以很好地发挥作用。

## 材料（对方案 1 的补充）

### 试剂

更昔洛韦（2mmol/L；InvivoGen，sud-gcv）<!>

小鼠：ZP3-Cre 转基因鼠（Shafi et al. 2000）

寡核苷酸

Cre 正向引物（5′-CTGCATTACCGGTCGATGCA-3′）

Cre 反向引物（5′-ACGTCCACCGGCATCAACGT-3′）

质粒 DNA：pCre 载体

这个载体含有一个修饰过的 Cre 序列，包含核定位信号和 Kozak 翻译保守元件；当电转化后需要产生 2 型等位基因结构时，可选用稍弱一些的表达载体。

## 方法

### 体外 Cre 基因转移以建立含有 2 型等位基因的胚胎干细胞亚克隆

1. 在含有 G418 的培养液的凝胶化培养皿中培养含有 *F* [*tkneo*] 等位基因的亲代 ES 细胞，直到汇合度达到 70%。
2. 参照方案 1 中的步骤 7～13，准备电转化。
3. 参照方案 1 中的步骤 14～16，将 0.2～2μg 超螺旋形式的 Cre 表达载体与 $1\times10^7$ 个细胞混合，电转化。

   超螺旋形式减小了 Cre 载体整合进 ES 细胞基因组的可能性。用少量载体可以提高产生 2 型等位基因的频率。
4. 将细胞以不同浓度（$2\times10^4$～$2\times10^5$ 个）铺于 10 个凝胶化的平板，培养 3d。
5. 在开始阴性筛选之前，换用含有 2μmol/L 更昔洛韦的培养液，继续培养，每 4～5d 更换一次培养液。
6. 参照方案 1 步骤 19～24 挑选和处理克隆。

   在不含 G418 和更昔洛韦的培养液中培养细胞。
7. 通过 Southern 杂交用基因组探针和 *loxP* 探针分析从复制平板中制备的 DNA 样品。

   在目标载体构建过程中分别使用两个探针应该能够观察到预期的基因组片段大小。在基因组的探针分析实验中 2 型等位基因经常会出现与野生型等位基因类似的或相同的迁移率。*loxP* 探针能够区别上述两种等位基因的结构。

### 通过 Cre-*loxP* 重组在体内进行条件性和系统性的基因诱变

在细胞培养和选择过程中，一些 ES 细胞克隆无法形成嵌合体小鼠。虽然染色体分型和体外分化法对消除非整倍体和有缺陷的 ES 细胞克隆有很大帮助，但还是不能完全清除所有无效 ES 细胞克隆。含有 2 型等位基因的动物对用表达 Cre 的病毒载体进行基因诱变是很有用的。

8. 从选择的 ES 细胞克隆产生嵌合体小鼠。

一般需要 2～3 个独立的 2 型突变等位基因，这样可以提高种系嵌合体小鼠的机会。

9. 一旦获得嵌合体小鼠，使之与表达 Cre 的转基因鼠（如 ZP3-Cre 转基因鼠）杂交，从而获得具有 1 型等位基因结构的子代。

在体内卵子发生时，2 型等位基因很容易被 Cre 重组，在子代中变为 1 型等位基因。

10. 依据鼠种系特异性背景饲养小鼠；或者使 Cre-*loxP* 小鼠互相交配，来产生纯合型小鼠种系（图 3A，见彩版）。

含有 2 型等位基因的小鼠可以被繁殖为具有确定体细胞表达类型的 Cre 转基因小鼠，通过形成 1 型等位基因产生组织或细胞类型特异的突变（图 3B，见彩版）（Marth 1996）。

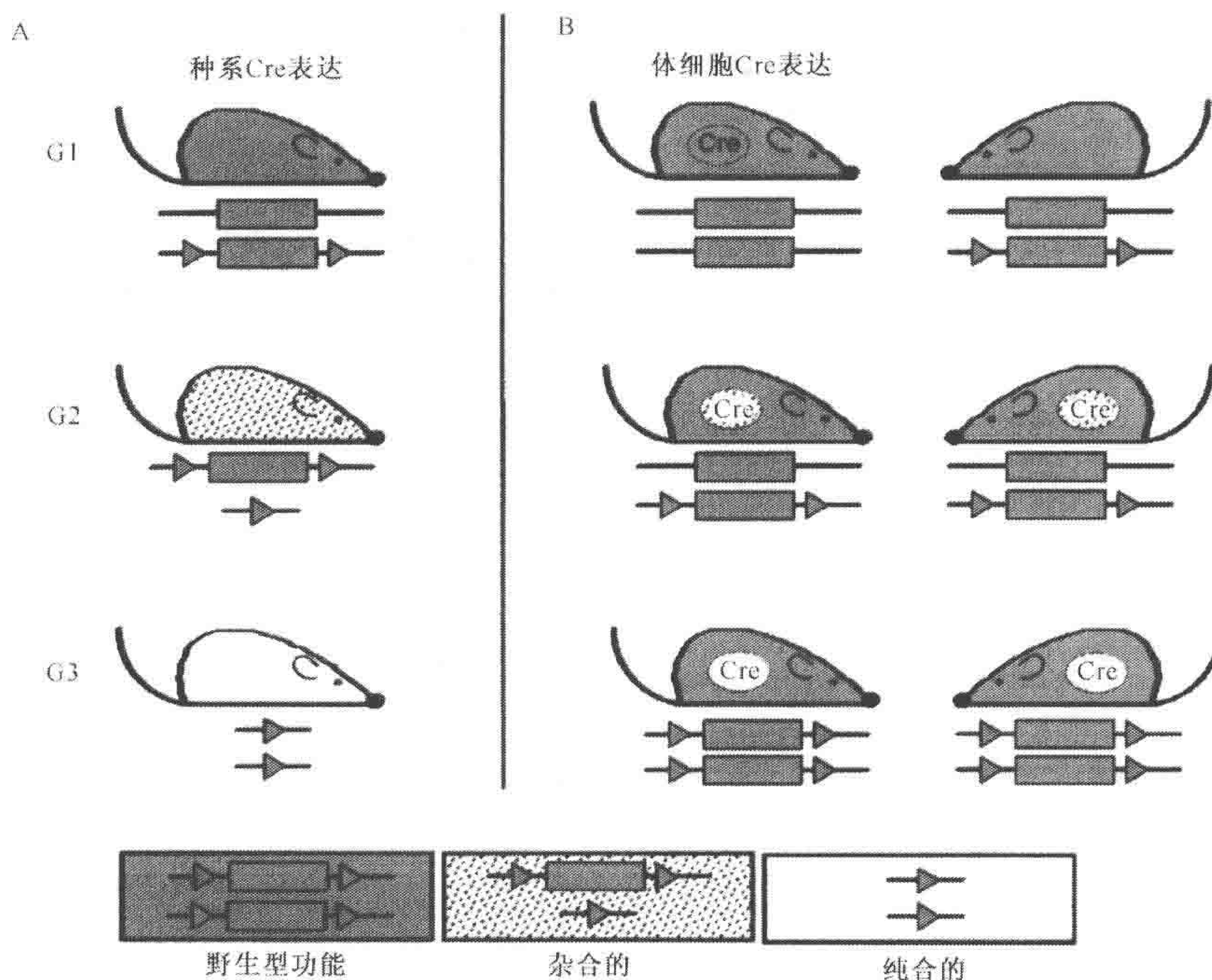



图 3. 在体内通过表达 Cre 重组酶对基因组合转入基因进行操作。A. 具有 *loxP* 位点间等位基因（等位基因的结构在小鼠下标注）的小鼠与具有表达 Cre 配子的 G1 代小鼠杂交，获得杂合性（G2）和纯合性突变（G3）；B. 体细胞中 Cre 的表达可以催化组织或细胞类型特意的重组，这种表达还可以通过可诱导启动子进一步调控。在 A 和 B 中，都有对照小鼠，用于观察 *loxP* 位点间 DNA 缺失引起的表型变化。

## 致谢

作者感谢 NIH（DK4247）和 Howard Hughes Medical Institute（J. D. M.）的支持。

## 参考文献


Abremski K. and Hoess R. 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* **259:** 1509–1514.

Andrews B.J., Proteau G.A., Beatty L.G., and Sadowski P.D. 1985. The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: Interaction with its target sequences. *Cell* **40:** 795–803.

Bucholz F., Angrand P.O., and Stewart A.F. 1998. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16:** 657–662.

Chui D., Oh-Eda M., Liao Y.-F., Panneerselvam K., Lal A., Marek K.W., Freeze H.H., Moremen K.W., Fukuda M.N., and Marth J.D. 1997. Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* **90:** 157–167.

de Alboran I.M., O'Hagan R.C., Gartner F., Malynn B., Davidson L., Rickert R., Rajewsky K., DePinho R.A., and Alt F.W. 2001. Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity* **14:** 45–55.

Fiering S.C., Kim C., Epner E., and Groudine M. 1993. An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the β-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8469–8473.

Fukushige S. and Sauer B. 1992. Genomic targeting with a positive-selection *lox* integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 7905–7909.

Golic K.G. and Lindquist S. 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59:** 499–509.

Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossmann H., and Rajewsky K. 1994. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265:** 103–106.

Hennet T., Hagen F.K., Tabak L.A., and Marth J.D. 1995. T cell-specific deletion of a polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase gene by site-directed recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 12070–12074.

Hoess R.H. and Abremski K. 1990. The Cre-lox recombination system. In *Nucleic acids and molecular biology* (ed. F. Eckstein and D.M. Lilley), vol. 4, pp. 99–109. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.

Kühn R., Schwenk F., Aguet M., and Rajewsky K. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269:** 1427–1429.

Lakso M., Sauer B., Mosinger B., Jr., Lee E.J., Manning R.W., Yu S.H., Mulder K.L., and Westphal H. 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 6232–6236.

Logie C. and Stewart A.F. 1995. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 5940–5944.

Mao X., Fujiwara Y., and Orkin S.H. 1999. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 5037–5042.

Marth J.D. 1996. Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. *J. Clin. Invest.* **97:** 1999–2002.

Metzger D., Clifford J., Chiba H., and Chambon P. 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 6991–6995.

Meyers E.N., Lewandowski M., and Martin G.R. 1998. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18:** 136–141.

Nagy A. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26:** 99–109.

Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., and Roder J.C. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8424–8428.

O'Donnell N., Zachara N.E., Hart G.W., and Marth J.D. 2004. *Ogt*-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 1680–1690.

O'Gorman S., Fox D.T., and Wahl G.M. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251:** 1351–1355.

Orban P.C., Chui D., and Marth J.D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 6861–6865.

Ramirez-Solis R., Liu P., and Bradley A. 1995. Chromosome engineering in mice. *Nature* **378:** 720–724.

Sauer B. 1992. Identification of cryptic *lox* sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosomal translocations that confer multiple drug resistance. *J. Mol. Biol.* **223:** 911–928.

Sauer B. and Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85:** 5166–5170.

Schmidt E.E., Taylor D.S., Prigge J.R., Barnett S., and Capecchi M.R. 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangement in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 13702–13707.

Senecoff J., Bruckner R.C., and Cox M.M. 1985. The FLP recombinase of the yeast 2-μm plasmid: Characterization of its recombination site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82:** 7270–7274.

Shafi R., Iyer S.P.N., Ellies L.G., O'Donnell N., Marek K.W., Chui D., Hart G.W., and Marth J.D. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 5735–5739.

Smith A.J., De Sousa M.A., Kwabi-Addo B., Heppell-Parton A., Impey H., and Rabbitts P. 1995. A site-directed chromosomal translocation induced in ES cells by Cre-*loxP* recombination. *Nat. Genet.* **9:** 376–385.

Soriano P. 1999. Generalized *lacZ* expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **21:** 70–71.

Soukharev S., Miller J.L., and Sauer B. 1999. Segmental genomic replacement in embryonic stem cells by double *lox* targeting. *Nucleic Acids Res.* **27:** e21.

te Riele H., Maandag E.R., and Berns A. 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stems cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 5128–5132.


## 网络资源

http://www.mshri.on.ca/nagy/

http://www.jax.org/resources/mouse_resources.html

# 第六十一章　在哺乳动物细胞中表达和鉴定核酶及短发夹 RNA

Mohammed Amarzguioui

The Biotechnology Centre of Oslo，University of Oslo，Gaustadalleen 21，0349 Oslo，Norway

时文涛　译



## 摘要

近几年，应用 RNA 干扰技术（RNAi）进行的功能基因组研究开展得非常广泛。RNAi 在各种调节基因表达的技术中是最新的也是最成功的，这些技术一般都是以反义作用为基础的。要把反义效应因子导入细胞，有两种主要的方法：从细胞外导入已经合成的效应分子或通过适当的载体在细胞内表达效应分子。通过外源导入引起的基因表达下调是暂时的，不适合用于对半衰期较长的蛋白质的研究，而且转染效率较低或经常变化也会引起其他潜在的问题。与之相反，以载体为基础的方法则可以建立稳定的转染子（Brummelkamp et al. 2002；Paddison et al. 2002；Perry et al. 2005），提高了实验的重复性；而且由于载体中包含报道基因，我们可以对转染的细胞进行分选、富集或追踪。稳定转染子中的表达也可以被设计成可诱导表达（van de Wetering et al. 2003；Bowden and Riegel 2004；Gupta et al. 2004；Tiscornia et al. 2004），从而对目的基因敲除的时间进行控制。有些细胞不易被转染（Shen et al. 2003；Tiscornia et al. 2003；Morris and Rossi 2004；Li et al. 2005），但应用病毒载体则可以解决这个问题。上述优点使载体介导的转染方法高度适用于以反义作用为基础的功能基因组学研究。

## 引言

自从 20 世纪 70 年代末通过反义作用对基因表达抑制的机制被发现（Zamecnik and

Stephenson 1978)，科研人员就对这类技术产生了极大的兴趣。应用这类技术的各种形式的前提是将一条与某基因序列完全互补的核苷酸链导入细胞，这条互补链通过破坏从基因到蛋白质的信息流来阻止基因的表达。这里讨论了两类适合于载体系统的反义效应因子：①锤头状核酶；②短发夹 RNA（shRNA）。相关方法还可以参考综述 Scherer Rossi（2003）。

核酶是一种短的（小于 50 个核苷酸）自然发生的催化性 RNA 模体，在自然界中与自身切割有关（Forster and Symons 1987）；但是在实验室中，这些序列也可以被设计成用于反式切割非自然目的序列（Haseloff and Gerlach 1989）。这类催化性 RNA 链包含大部分的保守序列，其识别的底物序列为 NU↓H（↓为切割位点）（Zoumadakis and Tabler 1995）。核酶的切割作用不依赖封闭机制并在理论上可以多次结合／解离，这是它优于基本反义核苷酸技术的地方。反义核酸和核酶的催化效率在很大程度上都依赖于 mRNA 的二级结构及目的杂交部位的可接近性，现在已经有很多确定可接近性杂交部位的实验技术及软件（Amarzguioui et al. 2000；Scherr et al. 2000；Ding and Lawrence 2003）。

对反义技术领域最新的补充是 RNAi 干扰（Fire et al. 1998；Hannon 2002）。在 RNAi 的起始阶段，与 RNase III 类似的 Dicer 酶（Bernstein et al. 2001）将长双链 RNA（dsRNA）切割成长度为 21～22bp 且 3′端有两个突出核苷酸的片段。这种切割的产物被命名为小干扰 RNA（siRNA），siRNA 被 RNA 诱导沉默复合体（RISC）利用来识别和引导同源 mRNA 的切割（Elbashir et al. 2001；Hammond et al. 2001；Liu et al. 2004）。RNAi 也可以被内源表达的 shRNA 所诱导，shRNA 是一端有一个短环封闭的 siRNA 双链（Brummelkamp et al. 2002；Paddison et al. 2002），两条链可以分别转录（N. S.，Lee et al. 2002）。shRNA 被内源表达的 microRNA（miRNA）模仿，miRNA 一般通过翻译抑制的机制来介导 RNAi（He and Hannon 2004）。RNAi 效应因子的序列对其功能是最重要的决定因素（Khvorova et al. 2003；Schwarz et al. 2003），其形成的二级结构应发挥最适宜的作用，这种认识帮助我们确立了 siRNA/shRNA 的设计原则（Amarzguioui and Prydz 2004；Reynolds et al. 2004；Huesken et al. 2005），及如何提高设计好的 siRNA/shRNA 作用的成功率。最近的报道表明应用比标准主干结构长的 siRNA 和 shRNA 会提高其作用的效率（Amarzguioui et al. 2006）。

表达载体一般包含效应因子的转录单位、适合于高水平表达的启动子、转录终止序列；如果要进行稳定表达，则还需要包含促进特异位点整合的序列和转染后的筛选标记。一般应用三种不同的表达策略：①聚合酶 II 驱动的表达盒；②以 tRNA 为基础的表达盒；③从本身包含的 RNA 聚合酶 III 启动子表达。

从聚合酶 II 起始的表达会产生含有载体衍生序列的异质转录物，载体衍生序列会影响效应因子的功能，这种顺式抑制作用可以通过在效应因子的上游和下游掺入核酶识别序列而减弱。shRNA 表达的初级转录物一般是没有活性的（Krol et al. 2004），可能是缺乏适当的加工造成的，这种加工可以通过应用 miRNA 表达背景进行，成熟的 miRNA 是通过用研究者想表达的 siRNA 序列替换初级 miRNA 中序列形成的（Zeng et al. 2003；Zeng and Cullen 2005）。所以实验中得到的嵌合体转录物可以被自然存在的 miRNA 加工途径（包括核酸酶 Drosha 和 Dicer）加工成熟（Y.，Lee et al. 2002；Y.，

Lee et al. 2003)。

另一种在较大转录物中表达短反义分子且使内源序列的抑制作用最小化的策略是利用 tRNA 作为表达背景。因为 tRNA 的结构是已知的，所以我们可以仔细选择效应因子盒的插入位置以将 tRNA 内源序列的抑制作用降到最低（Amarzguioui and Prydz 1998；Kato et al. 2001；Sano and Taira 2004)。这种方法也适合于表达功能性 shRNA（Oshima et al. 2003)。

最有效的且被广泛应用的表达反义效应因子的策略涉及自身包含的 RNA 聚合酶 III 启动子的转录，如 U6、H1、7SK，这样可以产生有明确起始和终止位点的转录物。在这个系统中，转录从启动子外的一个精确位置起始，当聚合酶遇到编码目的转录物表达盒后面的 5～6 个连续胸苷时结束。表达盒可以通过 PCR 或者寡盒（oligo cassette）策略构建，本章介绍了以后者为基础的实验方案。想阅读关于其他方法的细节，可以参考 Amarzguioui 等（2005)。

本章所描述的方法包括两条互补寡核苷酸的互补、为定向克隆启动子下游序列而用适当的突出端构建双链寡盒。为了确保转录从正确的位置起始且产生的转录物不含突出的 5′端序列，定点突变被引入启动子的末端以产生一个独特的克隆位点。H1 启动子的定点突变可以引入一个 *Bgl*II 位点，使其适合于 shRNA 介导的基因沉默（van de Wetering et al. 2003)。U6 启动子也可以通过类似的方法引入 *Bgl*II 切割位点，从而可以将相同的寡核苷酸盒克隆到多启动子后面（M. Amarzguioui et al. 未发表)。U6 启动子的修饰见图 1。修饰过的 U6 启动子通过 PCR 扩增，两端含有 *Bcl*I 和 *Nhe*I 的 PCR 产物被定向克隆到 pcDNA3.1＋（Invitrogen）表达载体的 *Bgl*II 和 *Nhe*I 位点之间，产生克隆载体 pcDNA3-U6M。这种以 PCR 为基础的克隆将额外的 *Bam*HI 和 *Not*I 引入启动子上游，使酶切分析和亚克隆变得更方便。用于锤头核酶和 shRNA 表达的寡核苷酸盒的设计见图 2。

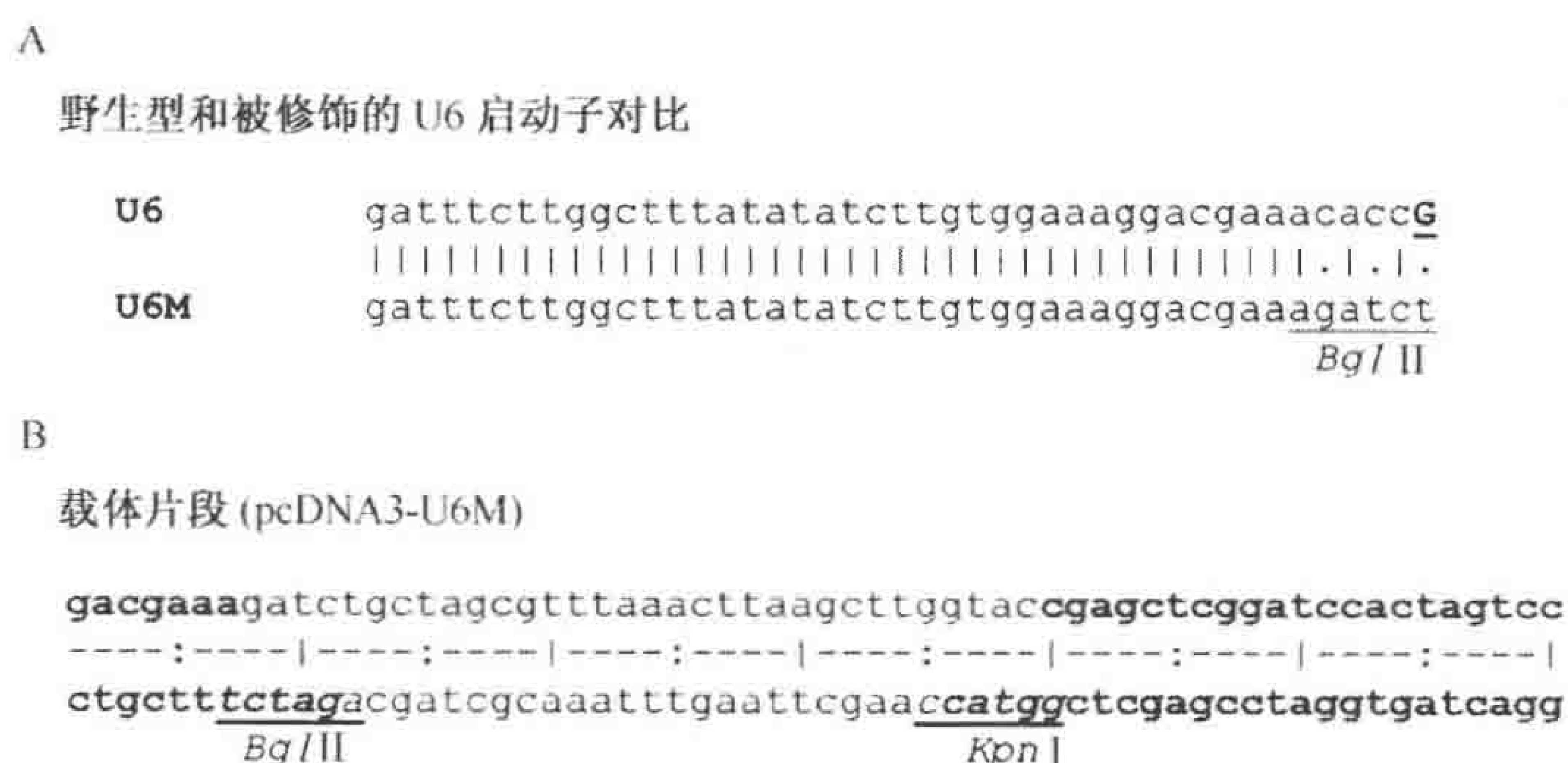



图 1. 启动子和载体序列的摘录。A. 野生型和修饰过的 U6 启动子的比较。野生型序列中下画线标记的大写字母是转录起始位点；B. 部分表达载体的序列，其中用于寡核苷酸盒克隆的特异位点被标识。

还有其他一些依赖于载体骨架表达系统的版本。例如，U6 启动子和这个启动子的四环素敏感版本（Czauderna et al. 2003)，H1 启动子（van de Wetering et al. 2003）被克隆到 pcDNA5/FRT/TO 表达载体（Invitrogen）中，分别构建出载体 pFRT-U6M、

目的序列：

5′ **GGCAGACUGAGUCGUGAUA**UCUACA 3′

核酶序列：

5′ **UAUCAC**cugaugagcgcguaagcgcgaa**ACUCAGUCUGCC** 3′

shRNA序列：

5′ **GGCAGACUGAGUCGUGAUA**UCUACAccugacccaUGUAGAUAUCACGACUCAGUCUGCC 3′

核酶寡核苷酸盒的设计：

```
A) 5′ GATCTATCACctgatgagcgcgtaagcgcgaaACTCAGTCTGCCTTTTTGTAC  3′
B) 3′     ATAGTGgactactcgcgcattcgcgcttTGAGTCAGACGGAAAAA      5′
```

shRNA寡核苷酸盒的设计：

```
A) 5′ GATCGGCAGACTGAGTCGTGATATCTACAcctgacccaTGTAGATATCACGACTCAGTCTGCCTTTTTGTAC 3′
B) 3′     CCGTCTGACTCAGCACTATAGATGTggactgggtACATCTATAGTGCTGAGTCAGACGGAAAAA      5′
```

图 2. 作用于相同目的序列的锤头核酶和 shRNA 中寡核苷酸盒的设计。核酶通过 6+12 个核苷酸的杂交臂（下画线标识）结合到 19 个核苷酸的目的序列。核酶编码寡核苷酸盒的组成（5′→3′的顺序）包括：一个 4 核苷酸的 *Bgl*II 突出端，一个 6 核苷酸的主干 I（stem I）杂交臂，催化核心，主干-环 II 序列（小写字母），12 个核苷酸的主干 III 杂交臂，终止子（TTTTT），一个 4 核苷酸的 *Kpn*I 黏性末端。设计的 shRNA 可以产生一个与锤头核酶目的序列相同的 siRNA。为了提高加工效率，shRNA 的主干区被延伸到 25bp（Rose et al. 2005；Siolas et al. 2005）。除在对应位置有相同的突出端和终止子序列外，shRNA 盒还包含：一段 25 个核苷酸的正链（用大写字母表示，其中 19 个核苷酸的黑体部分代表希望被加工产物的双链区），一个 9 核苷酸的环（用小写字母表示），以及一段 25 个核苷酸的反义链编码区。

pFRT-U6tet 和 pFRT-H1tet（M. Amarzguioui et al. 未发表）。所有这些载体都适用于本章介绍的方法。载体包含 Flp 重组酶识别序列，当载体与 Flp 重组酶共转染时可以在包含此序列的细胞中进行位点特异的重组。在表达四环素抑制因子的细胞系中，四环素敏感的载体可以被多西霉素诱导表达。以上两种功能可以在适当遗传背景（Flp-In T-Rex293 细胞，Invitrogen）的细胞系中整合。重组酶介导的稳定表达和四环素诱导的表达在本书的其他章节有更详细的描述。

## 方案

## 构建和表达以寡核苷酸为基础的反义盒

这里介绍了一种构建和克隆表达载体的方法，这种载体可用于将锤头核酶和 shRNA这样的反义效应因子导入培养的细胞系中。本章还介绍了用于目标验证的报道载体的构建。由于反义效应因子作用效率的差别，我们推荐针对不同位点设计多个效应因子。这些效应因子的相对作用效率可以很容易地通过报道基因共转染来检测，在这个检测实验中，一段包含所有目的位点的 cDNA 被定向克隆到一个报道 mRNA（psi-Check2，Promega）的 3′非翻译区。成功切割目的基因会导致报道 mRNA 的降解，伴

随而来的是翻译产物量的降低，而这种降低可以通过化学或生物发光进行检测。

## 材料

### 试剂

贴壁生长的哺乳动物（最好是人类）细胞系（如 HEK293 和 HCT116）

含有 LB 培养基和青霉素（50μg/ml）的琼脂平板

将 15g Batco 琼脂溶解在 1L 的 LB 培养基中，高压灭菌。冷却至 50℃后，加入 0.5ml 100mg/ml 的青霉素。

ATP（GE Healthcare Life Science）

牛小肠碱性磷酸酶（New England BioLab）

小量柱纯化试剂盒

完全细胞培养基和基础细胞培养基

10×DNA 连接酶缓冲液（500mmol/L pH 为 7.5 的 Tris-HCl、100mmol/L $MgCl_2$、100mmol/L DTT、10mmol/L ATP，并可选择性加入牛血清白蛋白至终浓度为 250μg/ml）

双萤光素酶报道检测系统（Promega E1910 或 E19600）

表达载体

pcDNA3-U6M，pFRT-U6M，pFRTU6tet，pFRT-H1tet（以上由作者提供）

pcDNA3.1（Invitrogen）

pcDNA5/FRT/TO（Invitrogen）

psiCheck（Promega C8021）

胶纯化试剂盒

感受态细菌（如 DH5α 和 DH10B）

Lipofectamine 2000（Invitrogen）

LB 培养基

称 10g 胰蛋白胨、5g 酵母提取物及 10g NaCl，溶入 900ml 去离子水中。用 5mol/L 的 NaOH 将 pH 调至 7.0，将体积加至 1000ml，高压灭菌。

1×NEB2 缓冲液（50mmol/L NaCl，10mmol/L pH7.9 的 Tris-HCl，1mmol/L DTT，10mmol/L $MgCl_2$，50mmol/L DTT）

多核苷酸激酶（New England BioLabs）

限制性内切核酸酶

*Bgl*II、*Kpn*I、*Xho*I、*Not*I、*Bam*HI

测序引物

U6-For 5′ccaaggtcgggcaggaag3′（$T_m$=60.9℃）

BGH-Rev 5′aggggcaaacaacagatggc3′（$T_m$=62.1℃）

RLuc-For 5′gaggacgctccagatgaaatg3′（$T_m$=59.5℃）

TK-Rev 5′tgagagtgtttcgttccttccc3′（$T_m$=60.8℃）

T4 DNA 连接酶（New England BioLabs）

目的特异的寡核苷酸

寡核苷酸应以最低的范围合成并只通过脱盐纯化。溶解在 10mmol/L pH7.5 的 Tris 缓冲液中，通过紫外分光光度计检测浓度，调整浓度至 100μmol/L 作为储存液。

1mol/L Tris 缓冲液（pH7.5）

称量 6.05g Tris，溶解在 30ml 去离子水中，用 5mol/L 的 HCl 调节 pH，最后用水定容至 50ml。

### 仪器

细菌培养皿

摇床

荧光/化学发光检测仪

组织培养皿（100mm）或烧瓶（T-75）

组织培养板（24 孔）

## 方法

### 寡核苷酸盒的制备

1. 为每一个寡核苷酸准备一个单独的 20μl 10μmol/L 的磷酸化反应：

| | |
|---|---|
| 100μmol/L 寡核苷酸储存液 | 2.0μl |
| 10×PNK 缓冲液 | 2.0μl |
| 10mmol/L ATP | 2.0μl |
| PNK | 5.0μl |
| $H_2O$ | 13.5μl |

37℃孵育 1h。

2. 将每个互补的磷酸化寡核苷酸各 10μl 混合。75℃孵育 10min 使酶失活并通过接下来的缓慢降温复性（逐渐降温至 30～40℃）。

   最终的寡核苷酸双链的浓度是 5μmol/L。

3. 稀释 25 倍，终浓度为 200nmol/L（对于 70bp 的寡核苷酸盒来说约为 9ng/μl）。

### 载体的制备

4. 在 50μl 1×NEB2 缓冲液中，用 30～40U *Bgl*II 和 *Kpn*I 消化 3～4μg 适当的载体（pcDNA3-U6M、pFRT-U6M、pFRTU6tet、pFRT-H1tet），37℃孵育 2～4h。
5. 加入 1μl 牛小肠碱性磷酸酶（10U/μl），再孵育 1h。

   一旦上一步的某一种酶的消化不完全，去磷酸化可以减少背景。

6. 用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离消化的片段。用干净的手术刀切割线性化的载体片段。留下 1～2μl 酶切反应体系作为步骤 8 的对照组。
7. 用胶纯化试剂盒纯化线性载体，将纯化的 DNA 溶解在 30～40μl 试剂盒提供的缓冲液或 10mmol/L Tris 缓冲液中（pH7.5）。
8. 通过电泳 1μl 纯化的 DNA 样品来估计载体 DNA 的浓度，将步骤 6 留下的样品作为

浓度标记。

## 线性载体与寡核苷酸盒的连接

9. 反应体系：

| | |
|---|---|
| 载体（一般 1～2μl） | 50ng |
| 200nmol/L 寡核苷酸盒 | 1.0μl |
| 10×DNA 连接缓冲液 | 0.5μl |
| T4 DNA 连接酶 | 0.5μl |
| 加 $H_2O$ 至总体积 | 5.0μl |

室温孵育 30min。

同时建立不含插入序列的阴性对照连接体系。

## 感受态细胞的转化

10. 将 3μl 连接产物与 30～50μl 感受态细菌混合，冰上孵育 30min，将剩余的连接反应产物储存在－20℃。
11. 将反应混合物在 42℃孵育 35～40s。立即置于冰上冷却 2min，加入 700μl LB 培养液，37℃振荡培养 45～60min。
12. 将一半培养液涂于包含 50μg/ml 青霉素的 LB 琼脂平板上，37℃培养过夜。

## 转化细菌的分析

13. 在转化的第二天检查琼脂平板；经过转化的平板上的克隆应该比对照平板多。用灭菌的枪头挑取 2～3 个克隆，并接种到 5ml 含有 50～100μg/ml 青霉素的 LB 培养结中。37℃振荡培养过夜。
14. 用柱分离试剂盒从转化菌中小量制备 DNA。将 DNA 溶解于 50μl 溶解缓冲液或 10mmol/L Tris 缓冲液中（pH7.5）。

    插入一个典型的 shRNA 表达盒后，与克隆质粒相比酶切释放的 DNA 片段的大小增加 40～50 对碱基（如克隆质粒的 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切释放片段分别为 327 对和 364 对碱基）。图 3A（见彩版）给出了构建的表达 shRNA 的质粒的酶切图谱。标识的限制酶适于进行限制酶酶切分析和质粒的亚克隆。

15. 对质粒进行酶切分析（在 10μl 反应体系中切割 0.3～0.5μg 的 DNA），可以用 *Bam*HI 或 *Not*I 来验证插入序列是否存在，并用克隆载体作为阴性对照。

    插入 shRNA 后，载体的长度会增加 40～50bp（用 *Bam*HI 和 *Not*I 切割的产物长度分别为 327bp、364bp）。一个典型的 shRNA 表达载体的图谱见图 3A。标出的酶可用于酶切分析和亚克隆。

16. 在步骤 15 鉴定出的阳性克隆用 U6-For 引物和 BGH-Rev 引物扩增。

## 构建双萤光素酶报道系统以评价效应因子

17. 扩增目的基因 cDNA 区域，这个区域包含所有的目的位点以及 5′多克隆位点上游 100 个和 3′下游 100 个核苷酸。

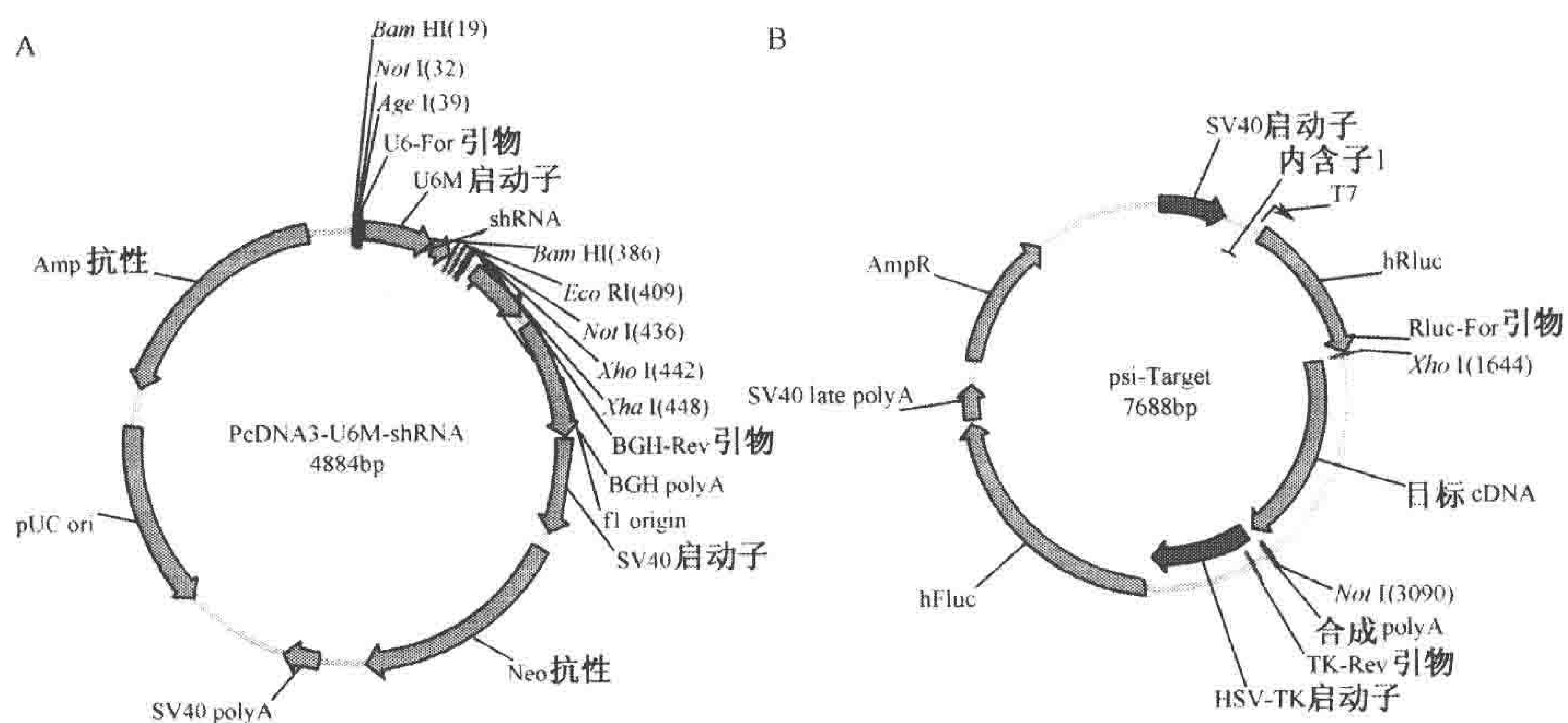



图3．表达质粒的典型图谱。A．典型的shRNA表达质粒的图谱；B．双萤光素酶报道载体图谱，在载体中有一个1.4kb的目的cDNA片段已经被克隆进psiCheck2的 *Xho*I＋*Not*I位点。

扩增时包含特异性靶序列可以减少形成目的基因错误二级结构的机会。前引物和后引物分别包含 *Xho*I 和 *Not*I 酶切位点，用于将PCR产物定向克隆进psiCheck2载体。确保酶切位点外面还包含另外4～6个核苷酸以提高对PCR产物的酶切效率。

18. 要克隆目的cDNA，参照步骤4～15，但某些步骤有所修改。在步骤9，插入序列的摩尔数应是线性载体的2～3倍。在步骤15，通过 *Xho*I＋*Not*I 酶切释放出插入序列来分析转化菌DNA。
19. 通过酶切鉴定的阳性克隆，用RLuc-For和TK-Rev引物扩增。

## 双萤光素酶报道系统与效应因子载体共转染

20. 在转染前16～24h，将细胞接种在24孔板里（每孔0.5ml），当开始转染时，细胞汇合度应达到60%～80%。
21. 每种细胞接种到3个孔，为所有的样品（*N*个）准备Lip/med（Lipofectamine 2000/培养液）混合液：

    Lip/med：50×*N*μl的基础培养液＋1.5×*N*μl的Lipofectamine 2000

    室温下孵育5～10min。
22. 混合报道DNA和效应因子DNA（包括一个无关的效应因子作为对照）用于转染（条件：100ng报道基因、100ng效应因子、每孔0.5μl Lipofectamine 2000）：

| | |
|---|---|
| 100ng/μl的报道基因 | 3.0μl |
| 100ng/μl的效应因子 | 3.0μl |
| 基础培养液 | 50μl |
| Lip/med（见步骤20） | 50μl |

    混匀，室温孵育30min（见步骤21）。
23. 在孵育混合物的过程中，吸出24孔板中的培养液，向每孔加入300μl新鲜的全培养液。或者只从每孔吸出200μl旧培养液。
24. 将50μl步骤22的混合物溶解在500μl全培养液中，向3个孔中每个孔加入200μl。

25. 将混合物与细胞共同孵育（期间不需更换培养液）直到转染后 24h。

26. 吸出培养液，向每孔加入 150μl 被动裂解缓冲液（在双萤光素酶报道系统试剂盒中提供），室温下轻柔振荡培养 15min。

27. 在荧光/化学发光检测仪上测量报道基因的表达（参照双萤光素酶报道系统试剂盒的操作手册）。

28. 以内部对照萤火虫萤光素酶为标准，规格化所有样品目标特异性 Renilla 萤光素酶的表达。设定对照组（转染无关效应因子的细胞）的表达效率为 100%，对照计算其他样品的相对表达水平。至少进行两次独立的平行实验，选择两个构建好的并证明高效表达效应因子的样品，用于进一步的研究。

## 参考文献


Amarzguioui M. and Prydz H. 1998. Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol. Life Sci.* **54:** 1175–1202.

———. 2004. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316:** 1050–1058.

Amarzguioui M., Rossi J.J., and Kim D. 2005. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett.* **579:** 5974–5981.

Amarzguioui M., Brede G., Babaie E., Grotli M., Sproat B., and Prydz H. 2000. Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **28:** 4113–4124.

Amarzguioui M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M.A., and Rossi J.J. 2006. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat. Protocols* **1:** 508–517.

Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., and Hannon G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409:** 363–366.

Bowden E.T. and Riegel A.T. 2004. Tetracycline-regulated expression of hammerhead ribozymes in vivo. *Methods Mol. Biol.* **252:** 179–194.

Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296:** 550–553.

Czauderna F., Santel A., Hinz M., Fechtner M., Durieux B., Fisch G., Leenders F., Arnold W., Giese K., Klippel A., and Kaufmann J. 2003. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res.* **31:** e127.

Ding Y. and Lawrence C.E. 2003. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **31:** 7280–7301.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411:** 494–498.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391:** 806–811.

Forster A.C. and Symons R.H. 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **49:** 211–220.

Gupta S., Schoer R.A., Egan J.E., Hannon G.J., and Mittal V. 2004. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 1927–1932.

Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., and Hannon G.J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293:** 1146–1150.

Hannon G.J. 2002. RNA interference. *Nature* **418:** 244–251.

Haseloff J. and Gerlach W.L. 1989. Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene* **82:** 43–52.

He L. and Hannon G.J. 2004. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5:** 522–531.

Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., et al. 2005. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23:** 995–1001.

Kato Y., Kuwabara T., Warashina M., Toda H., and Taira K. 2001. Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276:** 15378–15385.

Khvorova A., Reynolds A., and Jayasena S.D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115:** 209–216.

Kim D.H., Behlke M.A., Rose S.D., Chang M.S., Choi S., and Rossi J.J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* **23:** 222–226.

Krol J., Sobczak K., Wilczynska U., Drath M., Jasinska A., Kaczynska D., and Krzyzosiak W.J. 2004. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J. Biol. Chem.* **279:** 42230–42239.

Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P., and Rossi J. 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.* **20:** 500–505.

Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., and Kim V.N. 2002. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21:** 4663–4670.

Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., and Kim V.N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425:** 415–419.

Li M.J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J.K., Anderson J., Akkina R., and Rossi J.J. 2005. Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol. Ther.* **12:** 900–909.

Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., and Hannon G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305:** 1437–1441.

Morris K.V. and Rossi J.J. 2004. Anti-HIV-1 gene expressing lentiviral vectors as an adjunctive therapy for HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* **2:** 185–191.

Oshima K., Kawasaki H., Soda Y., Tani K., Asano S., and Taira K. 2003. Maxizymes and small hairpin-type RNAs that are driven by a tRNA promoter specifically cleave a chimeric gene associated with leukemia in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **63:** 6809–6814.

Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., and Conklin D.S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16:** 948–958.

Perry W.L., III, Shepard R.L., Sampath J., Yaden B., Chin W.W., Iversen P.W., Jin S., Lesoon A., O'Brien K.A., Peek V.L., et al. 2005. Human splicing factor SPF45 (*RBM17*) confers broad

multidrug resistance to anticancer drugs when overexpressed—A phenotype partially reversed by selective estrogen receptor modulators. *Cancer Res.* **65:** 6593–6600.

Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., and Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22:** 326–330.

Rose S.D., Kim D.H., Amarzguioui M., Heidel J.D., Collingwood M.A., Davis M.E., Rossi J.J., and Behlke M.A. 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res.* **33:** 4140–4156.

Sano M. and Taira K. 2004. Ribozyme expression systems. *Methods Mol. Biol.* **252:** 195–207.

Scherer L.J. and Rossi J.J. 2003. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* **21:** 1457–1465.

Scherr M., Rossi J.J., Sczakiel G., and Patzel V. 2000. RNA accessibility prediction: A theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **28:** 2455–2461.

Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., and Zamore P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115:** 199–208.

Shen C., Buck A.K., Liu X., Winkler M., and Reske S.N. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.* **539:** 111–114.

Siolas D., Lerner C., Burchard J., Ge W., Linsley P.S., Paddison P.J., Hannon G.J., and Cleary M.A. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotechnol.* **23:** 227–231.

Sohail M., Hochegger H., Klotzbucher A., Guellec R.L., Hunt T., and Southern E.M. 2001. Antisense oligonucleotides selected by hybridisation to scanning arrays are effective reagents in vivo. *Nucleic Acids Res.* **29:** 2041–2051.

Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., and Verma I.M. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1844–1848.

Tiscornia G., Tergaonkar V., Galimi F., and Verma I.M. 2004. CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 7347–7351.

van de Wetering M., Oving I., Muncan V., Pon Fong M.T., Brantjes H., van Leenen D., Holstege F.C., Brummelkamp T.R., Agami R., and Clevers H. 2003. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* **4:** 609–615.

Xing Z., Mahadeviah S., and Whitton J.L. 1995. Antiviral activity of RNA molecules containing self-releasing ribozymes targeted to lymphocytic choriomeningitis virus. *Antisense Res. Dev.* **5:** 203–212.

Yeo M., Rha S.Y., Jeung H.C., Hu S.X., Yang S.H., Kim Y.S., An S.W., and Chung H.C. 2005. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells. *Int. J. Cancer* **114:** 484–489.

Zamecnik P.C. and Stephenson M.L. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75:** 280–284.

Zeng Y. and Cullen B.R. 2005. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* **280:** 27595–27603.

Zeng Y., Yi R., and Cullen B.R. 2003. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 9779–9784.

Zoumadakis M. and Tabler M. 1995. Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX↓ consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23:** 1192–1196.

# 第六十二章　米非司酮诱导的基因调节系统

Kurt Schillinger[*], Xiangcang Ye[†], Sophia Tsai[*] 和 Bert W. O' Malley[*]

[*] Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030; [†] Department of Molecular Pathology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030

潘宇　译



## 摘要

米非司酮诱导的基因调节系统（MIGRS）是通过抗孕酮药——米非司酮（Mfp）来调控靶基因表达的体系。该体系利用一种反式激活嵌合蛋白质，此蛋白质重组了部分人孕酮受体的配体结合区（hPR-LBD）、源于酵母 Gal4 转录因子的 DNA 结合区以及反式激活区。在没有内源性孕酮存在的情况下，Mfp 作为一种反式激活子结合于靶基因启动子内上游区域的激活序列，并启动靶基因转录。

开关蛋白（geneswitch protein）与这种 Mfp 反应性启动子的相互作用可以是非配体依赖的，而 MIGRS 的主要局限就在于这种相互作用可启动转基因的基础表达。最近，减少基因基础表达的修订方案已被提出，这样靶基因的诱导倍率可得到显著增加。如所操作的基因有高度细胞毒性，那么微量的基因表达也不应忽略，因为即便最新一代的开关蛋白也可导致少量靶基因表达。

MIGRS 具有许多优点。它能与组织特异性启动子作用，可在空间与时间上调节基

因表达。MIGRS依赖于Mfp，而Mfp在人体中的研究已有25年之久，患者对它也有很好的耐受性。Mfp已被用于人妊娠终止诱导实验（Escudero et al. 2005），所用剂量100倍于目前用MIGRS诱导转基因或HD-Ad（辅助病毒依赖性腺病毒）感染小鼠靶基因表达所需的剂量。Mfp为脂溶性，可以穿过血脑屏障。因此，对于需要在大脑表达的质粒或中枢神经系统无开关蛋白表达的转基因动物，MIGRS都是理想的目的基因表达调控系统（Burcin et al. 1999）。这些特点使MIGRS成为一种可运用于各种体内实验、甚至在今后基因治疗中也有很好应用前景的研究手段。

## 引言

MIGRS的核心组件为一种嵌合的反式激活蛋白，称为开关蛋白，包含了源于酵母Gal4转录因子的DNA结合区、截短的hPR-LBD，以及反式激活区（源于HSV VP16蛋白或人NF-κB p65亚单位）。在缺乏孕酮拮抗剂Mfp时，此蛋白质主要以单体形式与热休克蛋白等分子伴侣结合成复合体存在于细胞质。当开关蛋白的孕酮LBD与Mfp结合后，开关蛋白变构而进入细胞核并发生自身二聚化。在核内，激活的开关蛋白二聚体通过其Gal4 DNA结合区与靶基因启动子内的Gal4上游活化序列（UAS）结合。由于结合位点是靶基因启动子内的酵母特异性增强子序列，且现尚未发现能与UAS结合的哺乳动物转录因子，因此认为靶基因的转录只能被结合Mfp的开关蛋白激活。与UAS结合后，开关蛋白的转录激活区促使转录起始前复合物在相邻TATA框形成，从而诱导下游靶基因的转录表达（图1）。在不与Mfp结合时，MIGRS有时也可产生低水平的靶基因表达。这种不依赖配体的转录激活称为基础表达，它是由于开关蛋白与UAS有不依赖配体的弱相互作用，而这种作用可见于所有可诱导系统中。改良的开关蛋白（见后述及图2）已致力于提高配体依赖的表达与基础表达的比例，即诱导倍率。这也是评估基因调节体系调控效果的重要参数。

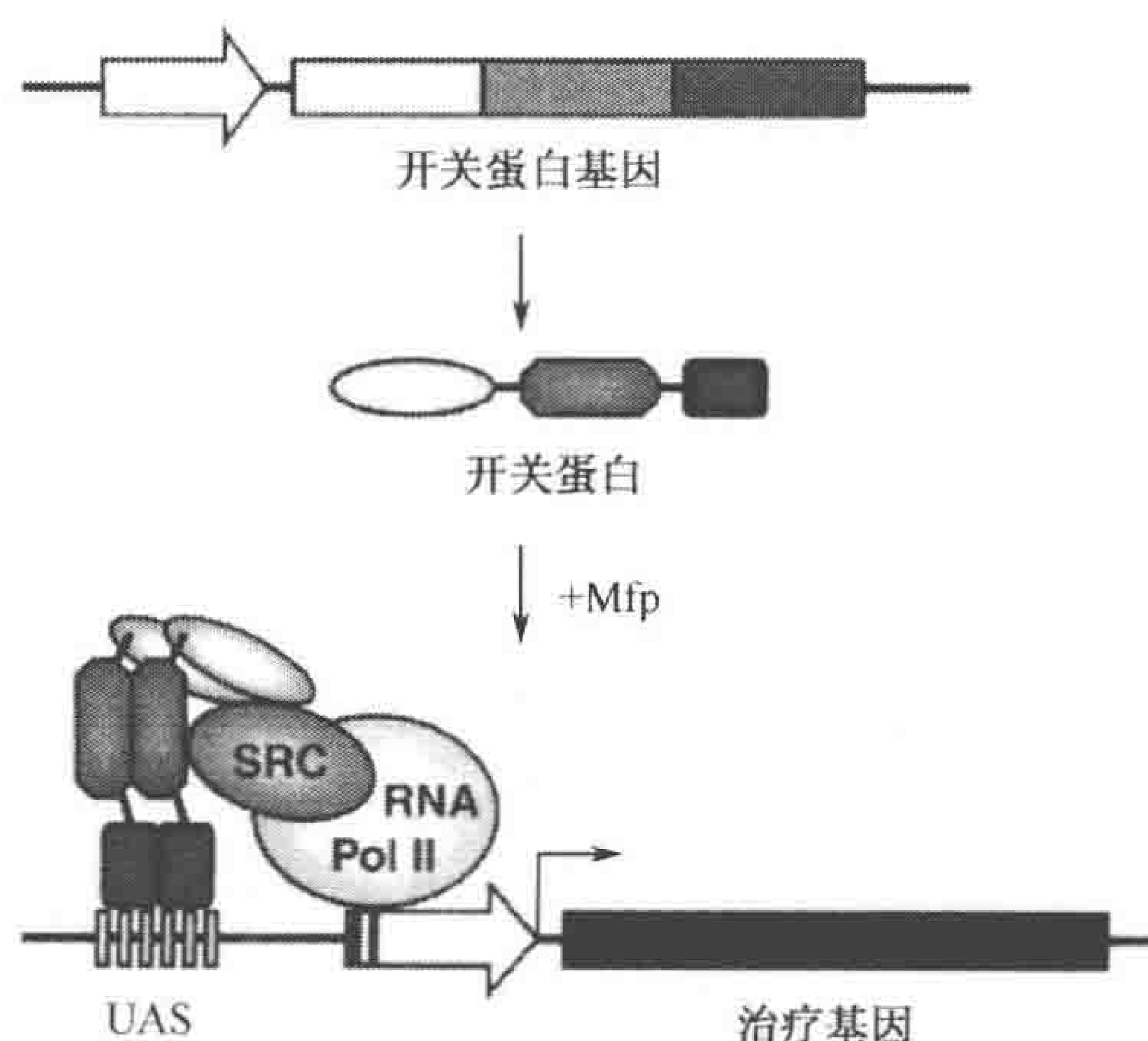



图1. MIGRS的结构与功能。Mfp存在时，嵌合的开关蛋白发生二聚化，与靶基因启动子上游激活序列（UAS）相互作用，驱动靶基因转录。

开关蛋白类型：

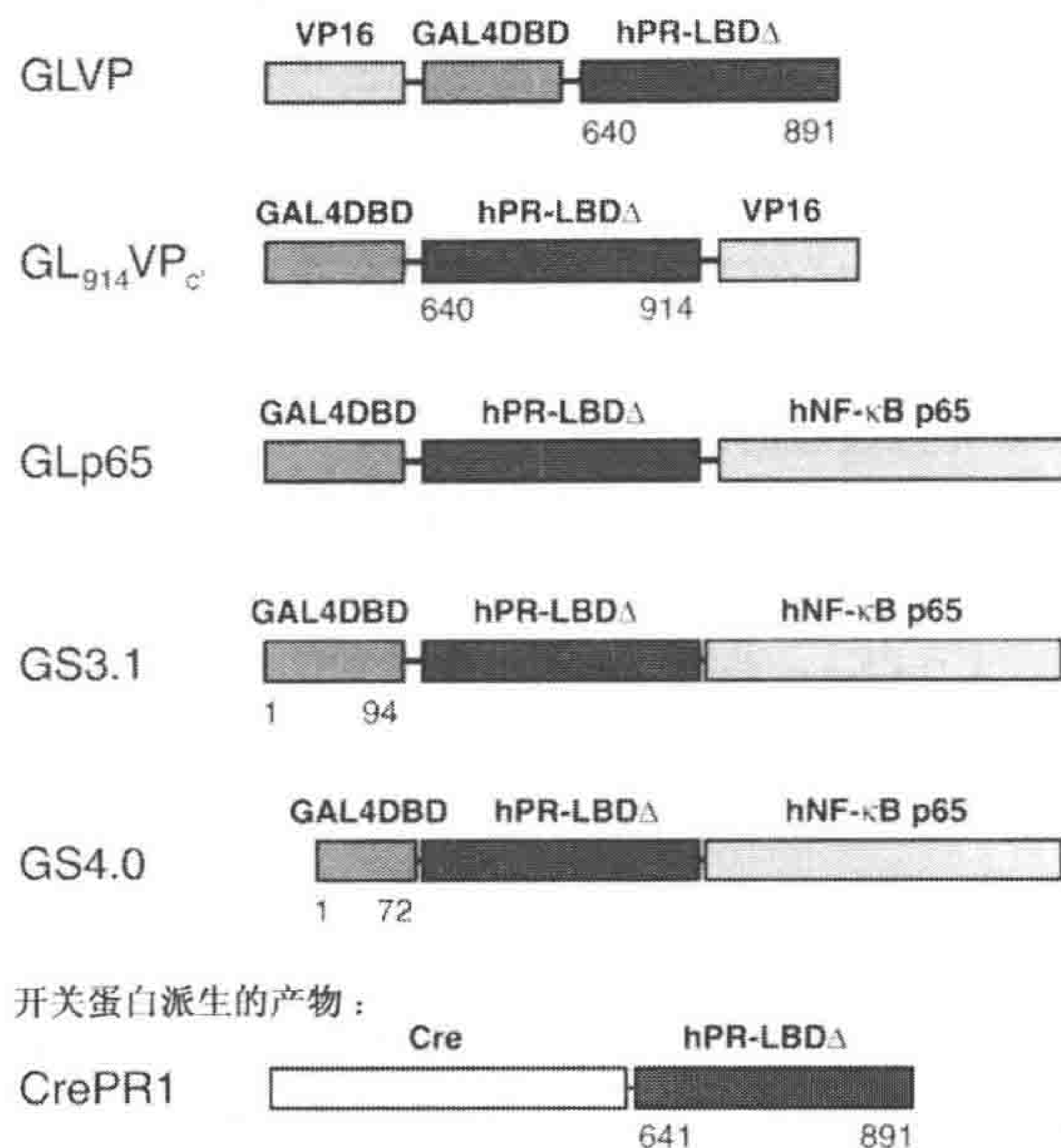



图 2. 现有的 MIGRS 嵌合转录激活子（开关蛋白）类型。

嵌合开关蛋白的关键组件是截去羧基端的 hPR-LBD。1992 年，Vegeto 等最先发现截除羧基端 42 个氨基酸的 hPR-LBD 失去了结合内源性孕酮的能力，但孕酮拮抗剂 Mfp 仍可对其发挥拮抗作用。1994 年，Wang 等将截去 42 个氨基酸的 hPR-LBD 与源于酵母 Gal4 转录因子的 DNA 结合区（1～94 残基）及 HSV VP16 蛋白的反式激活区（411～487 残基）进行重组，从而构建了第一代开关蛋白 GLVP。在体外，GLVP 虽然只诱导低水平的基础表达，但 Mfp 诱导后表达水平也不高，诱导报道基因表达倍率为 7～50，这与启动报道基因的 Mfp 反应性启动子密切相关（Wang et al. 1994）。

第二代开关蛋白 $GL_{914}VP_{c'}$ 源于 Wang 等的两个重要发现。首先，他们发现适当延长截取的 hPR-LBD 使之包括 hPR 的第 880～914 个氨基酸，可提高 Mfp 诱导 GLVP 激活靶基因表达的效果。之后，又发现将 VP16 反式激活区移至 GLVP 的羧基端可显著增加 Mfp 诱导该嵌合反式激活子的效能（Wang et al. 1997b）。通过以上两次改造，开关蛋白 $GL_{914}VP_{c'}$ 显示其诱导基因表达效果高于 GLVP 8～10 倍。且激活靶基因表达所需 Mfp 量也比 GLVP 低大约 10 倍。但 $GL_{914}VP_{c'}$ 同时也提高了基础表达水平，因此其诱导倍率并未与 GLVP 拉出差距（Wang et al. 1997b）。

第三代开关蛋白 GLp65 在改进基础表达和 Mfp 诱导的表达方面均有显著进步。1999 年，Burcin 等用来自人 NF-κB p65 亚单位（第 283～551 个残基）的反式激活区取代了 $GL_{914}VP_{c'}$ 上来自病毒 VP16 的相应区域。这样，GLp65 与 $GL_{914}VP_{c'}$ 相比表现出显著降低的基础表达水平与明显增高的 Mfp 诱导报道基因表达水平。因此 GLp25 的诱导倍率明显高于 $GL_{914}VP_{c'}$（Burcin et al. 1999）。将高免疫原性并有潜在细胞毒性的 VP16 区代之以人源蛋白质，使人源性氨基酸序列占了整个嵌合开关蛋白的 86%。

进一步的改良分别产生了 GLp65.1 和 GS4.0 这两个第三、四代开关蛋白。GLp65.1 与 GLp65 的唯一差别是 hPR-LBD 与 p65 之间的连接子，前者仅有 3 个氨基酸，而后者为 7 个氨基酸。两者在功能效果上基本相似（Abruzzese et al. 1999）。而 GS4.0 与 GLp65 差异较大。与后者相比，GS4.0 的 Gal4 DNA 结合区羧基端切去了 19 个氨基酸，Gal4 DNA 结合区与 hPR-LBD 之间连接子的氨基酸数也从 7 个减到 2 个。这些改造弱化了 Gal4 DNA 结合区序列引起蛋白质发生配体非依赖性二聚化的能力，因此 GS4.0 所致的基础表达水平较 GLp65 为低（Nordstrom，2002）。然而，这种蛋白质的质粒体内的使用还未完全通过测试。

最近一次对 MIGRS 的改造使一种受时空限制的基因靶向系统得以产生。该系统可使靶基因整合于特异性组织或控制靶基因在加入 Mfp 时发生整合。这个方案采用了一种独特的融合蛋白——CrePR1，其将 Vegeto 等提到的截断型 Mfp 反应性 PR-LBD 与细菌 Cre 重组酶融合（Cao et al. 2001）。缺乏 Mfp 时，CrePR1 停留在细胞质，与热休克蛋白等分子伴侣结合成复合物。当 Mfp 存在时，CrePR1 转移至核内，介导在 *loxP* 旁的靶位点特异性重组。最终可实现组织特异性、位点特异性以及 Mfp 诱导性重组（Cao et al. 2001）。当然，由于 CrePR1 的作用有赖于基因组的整合，而不仅是诱导靶基因表达，因此，该系统与利用开关蛋白的系统有明显差异。通过该系统，Mfp 的出现可使表达 CrePR1 特定细胞的基因表达发生持续性变化。此外，如果干细胞表达 CrePR1，那么这种基因表达的改变可在动物体内持续终生。

## 总体设计思路

如何使用 MIGRS 由所需靶基因表达的特点决定。需要高水平表达靶基因而不关注其基础表达的实验，与那些需对靶基因表达严格控制的实验有明显差异。该实验中可供调整的要点有，开关蛋白、启动开关蛋白的启动子以及靶基因启动子的选择。

利用较新一代的开关蛋白可诱导较高水平的靶基因表达，并保证低水平的基础表达。Mfp 诱导基因的表达特性也受到开关蛋白自身表达方式的调控。总体来说，CMV（巨细胞病毒）或 RSV-LTR（Rous 肉瘤病毒长末端重复序列）等组成型强启动子可显著提高最大诱导表达水平，但同时也升高基础表达水平。而组织特异性启动子则可降低基础表达和最大诱导表达水平，此外，与前者比较还可延长体内诱导时相（Ye et al. 2002）。现又设计出一种开关蛋白的可自我调控的启动子，它在 HSV 胸苷激酶最小启动子前包含了 4 个拷贝的 UAS。在无 Mfp 存在时，它可刺激可生成低水平的开关蛋白；当 Mfp 出现时，一方面，可通过正反馈通路刺激开关蛋白的表达，另一方面，可诱导靶基因表达。最终导致极低水平的基础表达和最大靶基因表达，但后者与其他启动子相比总体水平较低（Abruzzese et al. 2000）。

靶基因旁的启动子也非常重要。总的来说，在启动靶基因表达时，EIB TATA（源于 5 型腺病毒 E1B 基因的 TATA 框）较 HSV 胸苷激酶最小启动子的作用更为严格。后者比前者诱导靶基因表达水平高，但产生的基础表达水平也较高。同样，含更多拷贝 Gal4 UAS（多至 6 个）的启动子可诱导更高水平靶基因表达及基础表达（Ye et al. 2002）。

总之，MIGRS 一直通过各种方式的改造，尽可能在无米非司酮时降低靶基因表

达，而给予米非司酮后使基因表达最大化。最新一代 MIGRS 嵌合反式激活子通过体内、外多种实验，已显示了很强的调控高水平靶基因诱导表达的能力。

## 方案 1

## MIGRS 在培养细胞中的使用

在用于体内实验之前，强烈建议先在体外对诱导载体（质粒或病毒）进行检测。该方案通过标准细胞培养技术完成，但需考虑开关蛋白的组织特异性及病毒载体的组织倾向性对实验的影响。与质粒和临时转染一样，病毒载体体外实验的条件主要取决于经验、细胞类型、病毒质粒和启动子的使用。MIGRS 已被广泛应用于各种体外培养细胞系，包括 HeLa、CV1、HepG2 以及原始鸡成肌细胞等。表 1 总结了应用 MIGRS 瞬时转染的主要范例以供参考。

**表 1．MIGRS 用于不同的培养细胞**

| 调节蛋白 | 调节蛋白启动子 | 靶结构 | Mfp/(mol/L) | 诱导倍数[a] | 细胞 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GLVP | CMV | 4×UAS-tk-CAT | $10^{-7}$ | 10～15 倍 | CV-1 | Wang et al. (1994) |
| | CMV | 4×UAS-TATA-CAT | $10^{-7}$ | 50 倍 | CV-1 | Wang et al. (1994) |
| | RSV | 4×UAS-TATA-hGH | $10^{-8}$ | 24 倍 | HepG2 | Wang et al. (1994) |
| $GL_{914}VP_{c'}$ | TTRB | 4×UAS-TATA-luc | $10^{-8}$ | 20 倍 | HeLa | Burcin et al. (1999) |
| GLp65 | TTRB | 4×UAS-TATA-luc | $10^{-8}$ | n. a. | HeLa | Burcin et al. (1999) |
| GLp65. 1 | CMV | 4×UAS-TATA-SEAP | $10^{-8}$ | 44 倍 | HeLa | Abruzzese et al. (1999) |
| | CMV | 4×UAS-TATA-SEAP | $10^{-8}$ | 100 倍 | HeLa | Abruzzese et al. (1999) |
| | CMV | 4×UAS-TATA-SEAP | $10^{-8}$ | 10～133 倍 | COS-1，HepG2，NIH-3T3 | Abruzzese et al. (1999) |
| | 自诱导 | 4×UAS-TATA-SEAP | $10^{-8}$ | 221～6845 倍 | COS-1，HepG2，NIH-3T3 | Abruzzese et al. (1999) |
| | 自诱导 | 4×UAS-TATA-VEGF | $10^{-8}$ | ＞2500 倍 | 293 | Abruzzese et al. (1999) |
| | 自诱导 | 4×UAS-TATA-Epo | $10^{-8}$ | 766 倍 | COS-1 | Abruzzese et al. (1999) |
| GS4. 0 | α-actin | 4×UAS-TATA -GHRH | $10^{-8}$ | n. a. | 原始鸡成肌细胞 | Draghia-Akli et al. (2002) |

a. n. a. 指尚未有报道。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

培养细胞的相应培养液

二甲亚砜＜!＞（DMSO，Sigma-Aldrich D8418）

乙醇（80%）

Hank's 平衡盐液（HBSS）

米非司酮＜!＞（Mfp，RU-486；Sigma-Aldrich M8046）

Mfp 粉末装于棕色瓶，4℃保存。为避免 Mfp 暴露于空气中而凝固，在称量之前可将 Mfp

置于封闭容器中以平衡至室温。含 Mfp 的溶液应尽量避光。用 DMSO 溶解 Mfp 粉配置 $10^{-2}$ mol/L 的储存液。储存液可在−20℃中保存 6 个月。用于细胞培养实验时，用 80%乙醇稀释储存液至 $10^{-5}$ mol/L 作为工作液。工作液可在−20℃中保存 6 个月。将工作液加入细胞培养基使 Mfp 浓度为 $10^{-8}$ mol/L 或 $10^{-7}$ mol/L。

MEM 加入谷氨酸盐、抗生素、10%胎牛血清（FCS）

SFCS

细胞

适当的转染试剂

## 仪器

37℃ $CO_2$ 细胞培养箱

## 方法

1. 将载体转染细胞。

**质粒的转染**

a. 主要根据转染试剂相应的操作手册进行转染。

在保证通过不同质粒将 MIGRS 与靶基因转染入细胞的前提下，可调整这些质粒的比例以控制基础表达与靶基因诱导表达的水平。对于 GLVP 开关蛋白来说，GLVP 质粒与靶基因质粒摩尔比为 1∶10～1∶2.5。对于 GLp65 开关蛋白，两种质粒比例为 1∶1 时，可得到显著降低的基础表达。

强组成型启动子可引起较高基础表达，且开关蛋白与靶基因质粒比也较低。总之，这两种质粒比例的选择主要是经验性的，目的是得到理想的基础表达与靶基因诱导表达。

b. 转染后，立即用 HBSS 洗细胞，并在无 Mfp 培养基中孵育细胞至少 3h。

c. 用预温的含 $10^{-8}$ mol/L Mfp、5%～10%SFCS 细胞培养基换液。

**重组病毒载体的转染**

a. 根据病毒自身特点和感染细胞类型决定感染条件。

HSV 载体、第一代腺病毒载体、HD-Ad 载体已被分别用于 Vero、HeLa 及 HepG2 细胞。

b. 转染后，立即用 HBSS 洗细胞，以去除多余载体。

c. 将细胞转至正常培养基，使之恢复 3～12h。

d. 最后用含 $10^{-8}$ mol/L Mfp、5%～10%SFCS 细胞培养基换液

2. 用含 Mfp 培养基孵育细胞 24～72h，时间长短因不同细胞而异。
3. 收集细胞，分析靶基因表达情况（Ye et al. 2002）。

## 特例

一种同时携带 GLVP 与 LacZ 靶基因表达盒的 HSV 载体曾以 0.1moi（感染复数）转染 Vero 细胞。细胞在含 $10^{-7}$ mol/L Mfp、谷氨酸盐、抗生素、10% FCS 的 MEM 中孵育 24h 后，用 X-gal 染色观察 LacZ 表达情况（Oligino et al. 1998）。此外，还有另一种方案使用两个第一代腺病毒载体，其一编码 GLVP，另一个编码 CAT（氯霉素乙酰

转移酶）作为靶基因。用这两种质粒以每个细胞 10pfu 共感染 HeLa 细胞。之后将细胞在含 Mfp（$10^{-7}$～$2\times10^{5}$ mol/L）的培养基中孵育 16h。最后收集细胞并对 CAT 表达定量检测（Molin et al. 1998）。此外，还有一种同时携带 GLp65 与 hGH 靶基因表达盒的 HD-Ad 载体也被以 $5\times10^{7}$ IU 转染 $6\times10^{5}$ 的 HepG2 细胞。之后去除病毒，使细胞在含 5% SFCS 的培养基中恢复 3h。然后用含 5% SFCS 与 $10^{-8}$ mol/L Mfp 的培养基换液。24h 后，检测培养基中 hGH 表达水平（Burcin et al. 1999）。

## 方案 2

## 通过电穿孔法和质粒注射的 MIGRS 体内应用

Mfp 诱导靶基因在体内的表达包括基础表达、最大诱导水平以及靶基因表达的动力学，并受到多种因素的影响。这些因素包括基因注入方式、诱导的组织、启动开关蛋白表达的启动子、靶基因编码蛋白质的半衰期。如何使 MIGRS 产生满意结果，实验条件的选择往往是经验性的。编码 GLp65、GLp65.1 及 GS4.0 的质粒与靶基因的编码质粒，通过直接的肌肉注射和电穿孔，已被成功地联合应用于小鼠。与 MIGRS 瞬时转染相似，可通过调整开关蛋白质粒与靶基因质粒的比例、选择适当的开关蛋白启动子以及 DNA 肌肉注射量等途径来优化该系统体内实验的效果。该方案初步介绍 MIGRS 的体内应用方案。

### 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录

#### 试剂

小鼠

米非司酮< !>（Mfp，RU-486；Sigma-Aldrich M8046）

用于腹腔注射和灌胃时，用芝麻油将 $10^{-2}$ mol/L 的储存液稀释至 $2\times10^{-4}$ mol/L。将此稀释好的注射液置于 4℃过夜，以使之分层。注射前，将注射液置于室温避光处约 1h。该注射液可于 4℃保存 3 周，而 Mfp 活性不受影响。还可用能被生物降解的缓释颗粒包裹 Mfp 用于皮下接种，可实现 Mfp 稳定持续的注入。Innovative Research of America（Sarasota, Florida）公司的技术支持可获得最好的实验效果。计算包裹于一个颗粒中的 Mfp 量时，可用所需 Mfp 每日注射量（μg/kg）乘以动物平均体重（kg），再乘以 Mfp 给药天数。

质粒

质粒纯化试剂盒（大包装）

聚乙烯吡咯烷酮< !>或盐水

芝麻油（Sigma-Aldrich S3547）

#### 仪器

带两个平行板卡钳电极的电穿孔仪（可选，见步骤 3）

## 方法

1. 用质粒大包装纯化试剂盒（250～500μg）纯化质粒，具体操作参见试剂盒说明书。
2. 用 1mg/ml 聚乙烯吡咯烷酮或盐水重悬纯化好的质粒。
3. 将 25～50μg DNA 分别注入麻醉小鼠两侧胫前肌或腓肠肌。

    可在注射后用两个平行板卡钳电极行电穿孔和方波脉冲电转染，以提高肌肉转染效率。电穿孔的电压通常为在两个 25μs 的方波脉冲下以 375V/cm 转染两次。

4. 由于质粒注射后可有轻微的炎症反应，所以注射或电穿孔后让动物恢复 4d。
5. 根据动物体重计算 Mfp 用量，250～300μg/kg，用芝麻油稀释 Mfp 至 $2\times10^{-4}$ mol/L。通过腹腔注射或灌胃给药。

    或者，植入含 Mfp 的可降解缓释微粒可获得持续诱导靶基因表达的效果。

6. 给予特定剂量的 Mfp 后，根据质粒或靶基因表达产物在细胞质中的半衰期来选择分析目的基因表达的时间。

    如果不知道半衰期，在 Mfp 给药后首先要测定目标基因表达的表观动力学。

## 特例

Abruzzese 等通过注射或电穿孔按 1∶1（重量比）将两种质粒混合物（一种编码由 CMV 启动子调控的 GLp65.1，另一种在 3 个 Gal4 UAS 位点和 TATA 框的调控下编码 SEAP）注入 BALB/c 小鼠后腿肌肉（75μg /肌肉），给予 330μg/kg Mfp 后诱导 SEAP 表达平均增加 19 倍（1999）。血清中 SEAP 的峰值出现在给予 Mfp 后 2～3d。Abruzzese 等（2000）用一种自我诱导的启动子，不仅使 GLp65.1 表达，还在有 6 个 Gal4 UAS 和一个 TATA 框的背景下促使含 SEAP 的目的质粒得到表达。给予 330μg/kg Mfp 后，SEAP 基础表达显著降低，且最大诱导 SEAP 表达量增加 214 倍。Draghlia Akli 等（2002）通过注射或电穿孔将 2μg 的两种质粒（一种编码由骨骼肌特异性 α-actin 启动子调控的 GS4.0，另一种在 6 个 Gal4 UAS 位点和 TATA 框的调控下编码猪 GHRH）按 1∶10 注入 SCID 小鼠（亚急性联合免疫缺陷小鼠）胫腓前肌，21d 后通过腹腔注射连续 3d 给予 Mfp（250μg/kg）。于第四天检测血清中类胰岛素生长因子（IGF-1）发现，Mfp 诱导的 GHRH 表达使 IGF-1 水平稳定升高 1.1～1.7 倍。这种 Mfp 诱导的表达维持时间长达 149d（Draghia Akli et al. 2002）。以上通过质粒注射和电穿孔对 MIGRS 进行了不同的运用，显示了该系统在体内研究中的多功能性和稳定性。

## 方案 3

## 病毒介导的基因转染

MIGRS 与 HSV 和多种腺病毒载体已被联合应用于体内研究。病毒载体的使用和裸质粒注射及电穿孔有显著差别。最主要的一点是开关蛋白和目的蛋白盒被克隆于同一个载体上。此外，HD-Ad 载体已通过尾静脉注射以使之有效转染至肝脏。现在也可用

组织特异性启动子启动开关蛋白的正确表达。由于这类启动子往往弱于组成型表达的强病毒启动子，从而导致开关蛋白过量表达，随之引起目的蛋白基础表达水平增加，另外，也不要求病毒载体的高细胞转染率（Ye et al. 2002）。再者，当病毒载体通过系统给药时，即使载体能转入多种组织，靶基因表达也可有效的局限于特定组织。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

米非司酮<!>（Mfp，RU-486；Sigma-Aldrich M8046）

用于腹腔注射和灌胃时，按方案1用芝麻油将$10^{-2}$ mol/L的储存液稀释至$2\times10^{-4}$ mol/L。将此稀释好的注射液置于4℃过夜，以使之分层。注射前，将注射液置于室温避光处约1h，使之复温。该注射液可于4℃保存3周，Mfp活性不受影响。

啮齿动物

芝麻油（Sigma-Aldrich S3547）

### 仪器

定位装置或用于尾静脉注射的针头、注射器（见步骤1）

## 方法

1. 通过定位装置或系统尾静脉注射将编码MIGRS和靶基因盒的病毒载体注入动物体内（Oligino et al.，1998；Burcin et al.，1999；Schillinger et al.，2005）。

   通过这两种给药方式给予大量病毒，都能够造成较高的基础表达。基础表达和诱导表达水平取决于多种因素，包括病毒液中病毒颗粒与IU的比例、被转染组织的特点及用于启动开关蛋白表达的启动子。合适的转染条件需要经过摸索，建议以所有病毒液作为初始剂量。
2. 由于病毒载体注入后常伴局部炎症反应，因此注射后让动物恢复1～2周。
3. 用芝麻油稀释Mfp至$2\times10^{-4}$ mol/L，通过腹腔注射或灌胃给药。
4. 选择恰当时间点对目的基因表达情况进行分析。

   应通过血浆或细胞质中目的基因的半衰期来确定，如果不知道半衰期，则需摸索条件。

## 特例

Oligino等最早将MIGRS与病毒载体联合使用，他们用的HSV载体称为GVHLZ。这是一种双重组载体，它编码了由CMV启动的GLVP，同时在5个拷贝Gal4 USA序列及腺病毒E1B TATA框背景下编码细菌*lacZ*基因。Oligino等把$2\times10^{6}$ pfu的GVHLZ定向注入200～250g Sprague-Dawley大鼠海马中。12～36h后，Mfp（25mg/kg）通过腹腔注射给药。注射后48h，动物被处死，检测脑内β-gal表达。给予

了 Mfp 的动物脑组织提取液中 β-gal 表达较对照组高 150 倍。而对只注射了 GVHLZ 未注射 Mfp 的动物检测发现，其 β-gal 表达与基础水平比较并未显著升高，说明 MIGRS 对 β-gal 表达的有效调控（Oligino et al. 1998）。

MIGRS 还与减毒腺病毒或 HD-Ad 载体合用。Burcin 等 1999 年使用了一种称为 hGH-GLp65 的 HD-Ad 载体，这种载体编码了肝特异性转甲视蛋白启动的 GLp65，还在 4 个拷贝 Gal4 UAS 和一个 E1B TATA 框背景下编码 hGH。$1\times10^9$ 的 hGH-GLp65 感染颗粒被注入 20～25g C57BL/6J 小鼠尾静脉。2 周后，按 250μg/kg 将 Mfp 灌胃给药，并检测诱导 hGH 产生的动态变化。hGH 在给予 Mfp 后 3h 可被检测到，12h 达高峰，而 192h 后消退无法检测。注射 hGH-GLp65 后 8d 可在血清中检测到基础水平的 hGH，给予 250μg/kg Mfp 后 14d hGH 表达量可增加 50 000 倍。在 12 周内这种诱导增加的表达可重复达 5 次。最后，通过皮下植入含 360μg Mfp 的可降解颗粒使感染 hGH-GLp65 的小鼠表达 hGH 时间延长至 4 周（Burcin et al. 1999）。

## 方案 4

## 转基因模型

通过转基因小鼠模型，MIGRS 已被广泛应用于基因功能的研究。对该系统的运用包括采用方案 3 的方法建立两种不同的转基因动物系。

### 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

米非司酮＜!＞（Mfp，RU-486；Sigma-Aldrich M8046）

用于腹腔注射和灌胃时，按方案 1 用芝麻油将 $10^{-2}$ mol/L 的储存液稀释至 $2\times10^{-4}$ mol/L。将此稀释好的注射液置于 4℃过夜，以使之分层。注射前，将注射液置于室温避光处约 1h，使之复温。该注射液可于 4℃保存 3 周，Mfp 活性不受影响。通过皮下植入含 Mfp 的缓释可降解颗粒可获得持续稳定的转染效果。Innovative Research of America（Sarasota，Florida）公司的技术支持可获得最好的实验效果。计算包裹于一个颗粒中的 Mfp 量时，可用所需 Mfp 每日注射量（μg/kg）乘以动物平均体重（kg），再乘以 Mfp 给药天数。

小鼠

芝麻油（Sigma-Aldrich S3547）

#### 仪器

Northern 印迹或定量反转录 PCR 相应设备（见步骤 4）。

### 方法

1. 首先创建第一转基因基础鼠系。转入表达开关蛋白的载体，该蛋白质由组织特异性

启动子启动，保证了目的基因最后只能在特定组织中表达。

2. 创建第二转基因基础鼠系。转入目的基因载体，其中目的基因受 HSV 胸苷激酶或腺病毒 E1B TATA 等最小启动子调控，并位于多拷贝 Gal4 UAS 之后。
3. 激活靶基因表达（同方案 3 中将 MIGRS 用于基因治疗模型）。将 330μg/kg Mfp 溶于芝麻油（$2\times10^{-4}$ mol/L），通过腹腔注射或灌胃给药。

   可将含 Mfp 的可降解缓释颗粒植入皮下，从而获得稳定长期的目的基因表达。
4. 通过 Northern 印迹或反转录 PCR 分析各转基因基础鼠系中开关蛋白的表达特点。

   通常，高水平的开关蛋白表达可获得高水平的目的基因最大诱导表达，但同时也造成较高的基础表达。
5. 当明确了相应基因在两种基础鼠系中能恰当表达后，将两者杂交，从而获得能同时表达开关蛋白和 Mfp 诱导、组织特异性靶基因的双转基因鼠。

   与对基因治疗模型的转染相似，转基因模型中目的基因的基础表达和诱导表达水平取决于特定组织中开关蛋白的表达量。而开关蛋白表达水平又受相应启动子、染色体位置以及目的特定转基因鼠系中开关蛋白表达盒数影响。

## 特例：双转基因鼠的建立

在最早对转基因鼠 MIGRS 的研究中，Wang 等（1997a）建立了双转基因小鼠，这种小鼠具有启动 GLVP 开关蛋白表达的来源于肝特异性转甲视蛋白的启动子，还有在 HSV 胸苷激酶最小启动子和 4 个拷贝 Gal4 USA 背景下编码 hGH 基因的表达盒。在缺乏 Mfp 时，该双转基因小鼠血清中可检测到最低水平的 hGH。腹腔注射 Mfp 后，血清中 hGH 水平升高 5800～33 000 倍。每 2 天接受一次腹腔注射的双转基因鼠在 10d 内体重增加了 30%～37%（Wang et al. 1997a）。Pierson 等（2000）将 Wang 等表达肝特异性 GLVP 的小鼠与另一种小鼠杂交，这种小鼠具有在 4 拷贝 Gal4 UAS 和一个 HSV 胸苷激酶启动子背景下编码 Inhibin-A 目的基因的组件。杂交得到的雄性双转基因小鼠腹腔注射 250μg/kg 和 500μg/kg Mfp 后分别得到生理（436pg/ml）和超生理（1.2ng/ml）水平的 Inhibin A 表达。此外，将这种双转基因小鼠转变为 Inhibin-α 缺陷背景后，在 3 周大时通过植入缓释 Mfp 颗粒（6μg/d）激活 Inhibin-A 表达，可阻止 Inhibin-α 缺陷相关的性索瘤的发生（Pierson et al. 2000）。

GLp65 开关蛋白同样可使 Mfp 诱导的靶基因在双转基因小鼠中表达。Zhao 等（2001）建立了一种具有 GLp65 表达盒的开关蛋白基础鼠系，该表达盒由肺特异性表面活性蛋白 C 启动子启动。另一种鼠系具有成纤维生长因子 3（FGF-3）表达盒，这个表达盒受一个弹性蛋白酶启动子和 4 拷贝 Gal4 UAS 调控。将这两种基础鼠系杂交得到双转基因鼠。66～200μg/kg 的 Mfp 通过腹腔注射 30d，检测发现该鼠肺 FGF-3 表达量呈剂量相关。将 500μg Mfp 缓释颗粒植入这种双转基因鼠也导致肺 FGF-3 表达稳定升高，并伴有成年肺中巨噬细胞渗出与 2 型肺泡细胞增殖（Zhao et al. 2001）。乳腺中 GLp65 开关蛋白参与的、Mfp 诱导的 FGF-3 表达的研究也有报道。Ngan 等（2002）建立了一种表达 GLp65 的基础鼠系，其表达受乳腺特异性鼠肿瘤病毒（MMTV）启动子启动。并将这种鼠系与 Zhao 等（2001）使用过的 UAS-FGF-3 基础鼠系杂交。将缓释 Mfp 颗

粒（150～450μg/kg）植入这种小鼠可引起乳腺 FGF-3 呈剂量依赖性升高。Mfp 可诱导该双转基因青春期雌性鼠异常表达 FGF-3，从而导致乳腺异常发育（Ngan et al. 2002）。最后，Lutucuta 等（2004）对心特异性 GLp65 的表达进行了研究。他们建立的基础鼠系含有鼠 α-肌球蛋白重链启动子启动的 GLp65 表达盒，将其与一种含心肌钙蛋白 T-Q92（cTnT-Q92）表达盒的鼠系杂交，后者表达盒受 4 拷贝 Gal4 UAS 和 E1B TATA 框调控。杂交后得到双转基因鼠在 Mfp 诱导下表达心特异性 cTnT-Q92。按 1000μg/(kg・d）给予 Mfp 至少 16d，可检测到小鼠 cTnT-Q92 持续表达。皮下植入 Mfp 颗粒[按 1000μg/(kg・d）释放] 同样导致该种小鼠 cTnT-Q92 表达，持续时间可达 70d。cTnT-Q92 的短期诱导表达与该鼠心肌收缩增强有关，而长期诱导则导致心脏间质纤维细胞增加。Mfp 消失后，这些作用均可逆（Lutucuta et al. 2004）。

## 特例：CRE-PR1 系统在转基因动物中的使用

Cre-PR1 诱导基因重组系统主要在转基因动物模型中研究过。将组织特异性表达的 Cre-PR1 与 Mfp 联合使用，可使基因重组的发生具有时间与空间上的特异性。Cao 等（2001）利用一种双转基因鼠建立了单纯大疱性表皮松懈（EBS-DM）小鼠模型，它含表皮细胞特异性启动子启动的 Cre-PR1 的表达盒，还含有一种突变角蛋白 14（K14）表达盒，该表达盒在一种干扰 *neo* 基因受 Cre 调节剪切后被转录激活。对这种小鼠前足和前脚掌用 Mfp 滴注 2～7d 可形成局部大水泡，与 EBS-DM 组织学特征相同（Cao et al. 2001)。Arin 等（2001）也用同样方法建立了一种表皮松懈型角化过度（EHK）诱导模型。在这种双转基因模型小鼠中，Mfp 诱导的受 Cre-PR1 调节的重组激活了角蛋白 10 的一种突变体的表达，从而在滴注 Mfp 后小鼠同样表现出 EHK 的病理特征（Arin et al. 2001)。最后，出生后心脏及成年脑的小鼠 Mfp 诱导基因剪切模型都已被建立。Minamino 等（2001）用心脏特异性 αMHC 启动子在 ROSA-Cre 背景下表达了 Cre-PR1。对 3 周龄小鼠腹腔注射 Mfp（250μg），连续 5d，可导致心脏 *lacZ* 表达显著增加（Minamino et al. 2001)。Kellendonk 等（1999）和 Kitayama 等（2001）用 CamKllα、Thy-1 和 GluRγ2 脑特异性基因启动子在 ROSA-Cre 背景下表达 Cre-PR1，从而建立了相似的双转基因报道鼠系。

### 参考文献


Abruzzese R.V., Godin D., Burcin M., Mehta V., French M., Li Y., O'Malley B.W., and Nordstrom J.L. 1999. Ligand-dependent regulation of plasmid-based transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* **10:** 1499–1507.

Abruzzese R.V., Godin D., Mehta V., Perrard J.L., French M., Nelson W., Howell G., Coleman M., O'Malley B.W., and Nordstrom J.L. 2000. Ligand-dependent regulation of vascular endothelial growth factor and erythropoietin expression by a plasmid-based autoinducible geneswitch system. *Mol. Ther.* **2:** 276–287.

Arin M.J., Longley M.A., Wang X.J., and Roop D.R. 2001. Focal activation of a mutant allele defines the role of stem cells in mosaic skin disorders. *J. Cell Biol.* **152:** 645–649.

Burcin M.M., Schiedner G., Kochanek S., Tsai S.Y., and O'Malley B.W. 1999. Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 355–360.

Cao T., Longley M.A., Wang X.J., and Roop D.R. 2001. An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex: Implications for gene therapy. *J. Cell Biol.* **152:** 651–656.

Draghia-Akli R., Malone P.B., Hill L.A., Ellis K.M., Schwartz R.J., and Nordstrom J.L. 2002. Enhanced animal growth via ligand-regulated GHRH myogenic-injectable vectors. *FASEB J.* **16:** 426–428.

Escudero E.L., Boerrigter P.J., Bennink H.J., Epifanio R., Horcajadas J.A., Olivennes F., Pellicer A., and Simon C. 2005. Mifepristone is an effective oral alternative for the prevention of premature luteinizing hormone surges and/or premature luteinization in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90:** 2081–2088.

Kellendonk C., Tronche F., Casanova E., Anlag K., Opherk C., and Schutz G. 1999. Inducible site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.* **285:** 175–182.

Kitayama K., Abe M., Kakizaki T., Honma D., Natsume R., Fukaya M., Watanabe M., Miyazaki J., Mishina M., and Sakimura K. 2001. Purkinje cell-specific and inducible gene recombina-

tion system generated from C57BL/6 mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281:** 1134–1140.

Lutucuta S., Tsybouleva N., Ishiyama M., Defreitas G., Wei L., Carabello B., and Marian A.J. 2004. Induction and reversal of cardiac phenotype of human hypertrophic cardiomyopathy mutation cardiac troponin T-Q92 in switch on-switch off bigenic mice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44:** 2221–2230.

Minamino T., Gaussin V., DeMayo F.J., and Schneider M.D. 2001. Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated cre fusion protein. *Circ. Res.* **88:** 587–592.

Molin M., Shoshan M.C., Ohman-Forslund K., Linder S., and Akusjarvi G. 1998. Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments. *J. Virol.* **72:** 8358–8361.

Ngan E.S., Ma Z.Q., Chua S.S., DeMayo F.J., and Tsai S.Y. 2002. Inducible expression of FGF-3 in mouse mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 11187–11192.

Nordstrom J.L. 2002. Antiprogestin-controllable transgene regulation in vivo. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13:** 453–458.

Oligino T., Poliani P.L., Wang Y., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Fink D.J., and Glorioso J.C. 1998. Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector. *Gene Ther.* **5:** 491–496.

Pierson T.M., Wang Y., DeMayo F.J., Matzuk M.M., Tsai S.Y., and Omalley B.W. 2000. Regulable expression of inhibin a in wild-type and inhibin α null mice. *Mol Endocrinol.* **14:** 1075–1085.

Schillinger K.J., Tsai S.Y., Taffet G.E., Reddy A.K., Marian A.J., Entman M.L., Oka K., Chan L., and O'Malley B.W. 2005. Regulatable atrial natriuretic peptide gene therapy for hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 13789–13794.

Vegeto E., Allan G.F., Schrader W.T., Tsai M.J., McDonnell D.P., and O'Malley B.W. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell.* **69:** 703–713.

Wang Y., DeMayo F.J., Tsai S.Y., and O'Malley B.W. 1997a. Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **15:** 239–243.

Wang Y., O'Malley B.W., Jr., Tsai S.Y., and O'Malley B.W. 1994. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 8180–8184.

Wang Y., Xu J., Pierson T., O'Malley B.W., and Tsai S.Y. 1997b. Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther.* **4:** 432–441.

Ye X., Schillinger K., Burcin M.M., Tsai S.Y., and O'Malley B.W. 2002. Ligand-inducible transgene regulation for gene therapy. *Methods Enzymol.* **346:** 551–561.

Zhao B., Chua S.S., Burcin M.M., Reynolds S.D., Stripp B.R., Edwards R.A., Finegold M.J., Tsai S.Y., and DeMayo F.J. 2001. Phenotypic consequences of lung-specific inducible expression of FGF-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 5898–5903.

# 第六十三章　二聚体介导的基因表达调控

Victor M. Rivera，Lori Berk 和 Tim Clackson

ARIAD Gene Therapeutics，Inc.，Cambridge，Massachusetts 02139

陈绚丽　译



## 摘要

化学调控靶基因转录的方法有很多种，最常见的是利用影响转录因子活性的别构调节物进行调控。其中的一个方法是运用二聚化的诱导剂或者二聚体在无活性的融合蛋白上重组有活性的转录因子。最常用的体系是将天然产物雷帕霉素（rapamycin）或者无生物活性的类似物作为二聚化的药物。这种方法的一个主要特征就是其调控具有紧密性，通常基础表达不可见，而诱导表达的水平可同组成型启动子诱导的水平相比。我们的实验大部分是运用白细胞介素-2（IL-2）的最小启动子，而换用猴病毒 40（SV40）或者巨细胞病毒（CMV）的最小启动子则会导致基础表达明显较高。成功运用这种方法最主要的因素是获得高表达的活化区域融合蛋白。在临床的基因治疗方面，为人类蛋白质而专门建立是该方法的优势，在临床上具有使免疫原性减到最少的潜在作用。二聚体体系已被成功合并入不同的载体中，用于体内或体外基因表达的长期调控。本章是为设计构建实验以在体内外获得由二聚体调控的靶基因表达提供指导。

## 引言

在真核生物中，基因表达的激活是由转录因子蛋白同靶基因的诱导结合来调控的。转录因子都属双功能蛋白质，它们识别靶基因附近的特异性 DNA 序列，募集细胞的转录元件而激活转录。转录因子的这些功能由两个区域负责，即 DNA 结合区域和转录激

活区域，这两个区域在功能上是独立的，但是能够重组为序列特异性的转录激活子，即使在分别表达为单个蛋白质的情况下，它们也能通过非共价的相互作用而聚到一起。

这种调节模型已被发展成利用二聚体诱导工程蛋白质的相互作用来调控基因转录的一种普遍方法（Ho et al. 1996；Rivera et al. 1996）。二聚体是可通透渗入细胞的有机分子，具有两个分离的模体，每个都能同特异性的蛋白调节子以高亲和性结合（Spencer et al. 1993）。通过融合这些调节子到DNA结合区和转录激活区域，重组成功能性的转录因子，使某个靶基因的表达绝对地受控于二聚体（图1）（Pollock and Clackson 2002）。

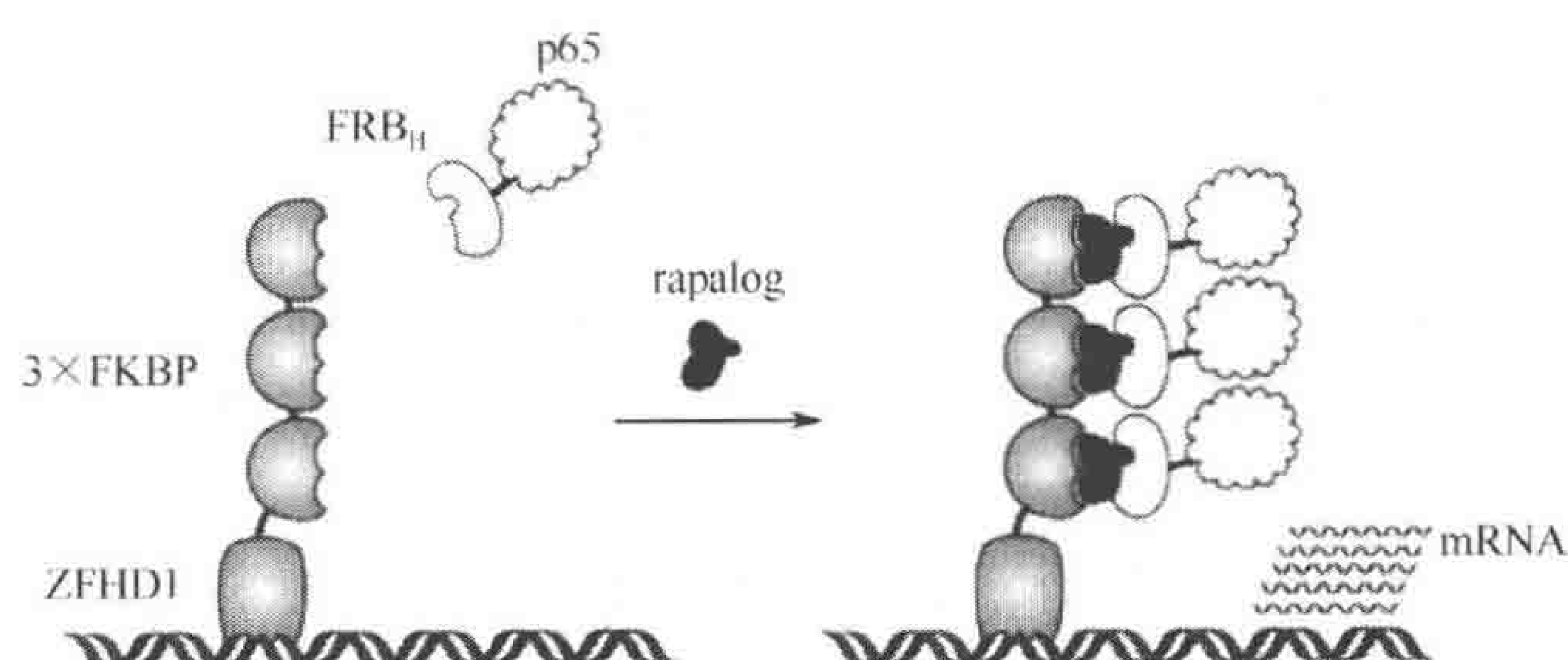



图1. 运用雷帕霉素类似物进行二聚体诱导的基因表达的模型（rapalog）。缩略语的解释见引言部分。

在原则上，任何克隆基因的表达都能通过给这个基因加载一段能够被工程性的DNA结合区域识别的上游序列来达到受控于二聚体的目的。而在将修饰基因引入也能够表达工程转录因子蛋白的细胞后，二聚体将会导致剂量依赖性的靶基因表达的激活。由于转录因子融合蛋白在没有二聚体的情况下彼此没有亲和性，调控特征为基因表达处于极低的而且通常不能被看到的水平（Rivera et al. 1996；Pollock et al. 2000）。另外，极强激活区域合并入体系之后一般会导致所诱导基因最高水平的表达，等同于这些基因获得了强组成型启动子或者增强子引起的表达（Pollock et al. 2000）。

虽然几种二聚体体系都有其特征，应用最广的是基于雷帕霉素或其类似物的体系。雷帕霉素是一种天然的异二聚体产物，有口服生物利用度好、药理学有利及化学方面的可获得现成的类似物制剂等优点。雷帕霉素系统已被用于在体外瞬时或稳定转染的多种不同细胞株中调控基因表达，也被成功地合并到大多数体内的载体系统中，包括腺病毒、腺相关病毒AAV、反转录病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒、裸露DNA（Pollock and Clackson 2002）等。用于实验动物的尤以腺病毒、腺相关病毒AAV载体为主，例如，在非人的灵长类动物内，雷帕霉素作用于单独的AAV载体紧密调控促红细胞生成素（EPO）的产生证实已超过6年（Rivera et al. 2005）。所有一系列描述应用二聚体调控转录的文献可查看 http://www.ariad.com/regulationkits/reg_ref3.html。

## 雷帕霉素诱导体系的组分

雷帕霉素同胞质蛋白FKBP12（FKBP与FK506结合的蛋白质）和一种大的丝 苏氨酸蛋白激酶，称为FRAP［FRBP-雷帕霉素相关蛋白，即mTOR（哺乳动物的雷帕霉素靶点）］有高度亲和性，有与这两种蛋白质相结合的功能，因此作为异源二聚体将这

两种蛋白质聚到一起（Choi et al. 1996）。为调控靶基因转录，将 DNA 结合区域融合到一个或多个 FKBP 结构域，将转录激活区域融合到 FRAP 的 93 位氨基酸部分，称为 FRB，这样足以结合 FKBP-雷帕霉素复合物（Chen et al. 1995）。只有在雷帕霉素存在的情况下，这两种融合蛋白才能发生二聚化，因而激活具有与 DNA 结合区域相结合的位点的基因进行转录（River et al. 1996）。

在有的情况下，由于雷帕霉素抑制内源性 FRAP 激酶活性，运用雷帕霉素可能会产生抗增殖和免疫抑制效应而被放弃。为了克服这种限制而设计了功能上无生物活性的雷帕霉素类似物，称为 rapalog。这些化合物经过了化学修饰从而不再同野生型的内源性 FRAP 紧密结合，大大减少了免疫抑制活性，但它们能结合设计的含有单个氨基酸突变修饰的 FRAP。将这种突变合并到已融合到激活区域上的 FRB 结构域，能够使得 rapalog 被用于专门使工程性的转录因子融合蛋白发生异源二聚化而不干扰内源性 FRAP 活性（Pollock et al. 2000, 2002; Pollock and Clackson 2002; Rivera et al. 2005）。这样设计的体系也保留了对雷帕霉素本身产生反应的能力。

同雷帕霉素相比，AP21967 的抗增殖活性降低了（图 2），它是最常用于大多数体内外实验的雷帕霉素类似物。然而，雷帕霉素能够诱导表达的水平比 AP21967 更高，因而在抗增殖和免疫抑制活性不重要的情况下仍可应用。在体内，雷帕霉素采用间断地给药方式（如按天给药）可大大减低其免疫抑制活性。雷帕霉素类似物 AP23102 无残留的抗增殖活性，能在要求无抗增殖活性的时候应用于体外实验，它在体内的抗增殖作用还未经检测。雷帕霉素可透过小鼠的血脑屏障，AP21967 和 AP23102 是否可透过血脑屏障还不清楚。就二聚体的释放而言，雷帕霉素及其类似物均可通过口服被释放到实验动物体内（Magari et al. 1997; Rivera et al. 2005）。然而，在所需的剂量更高时，这些药的生物利用度大约只有 15%。雷帕霉素及其类似物水溶性都很低，以饮用水送服至动物体内尚无报道。

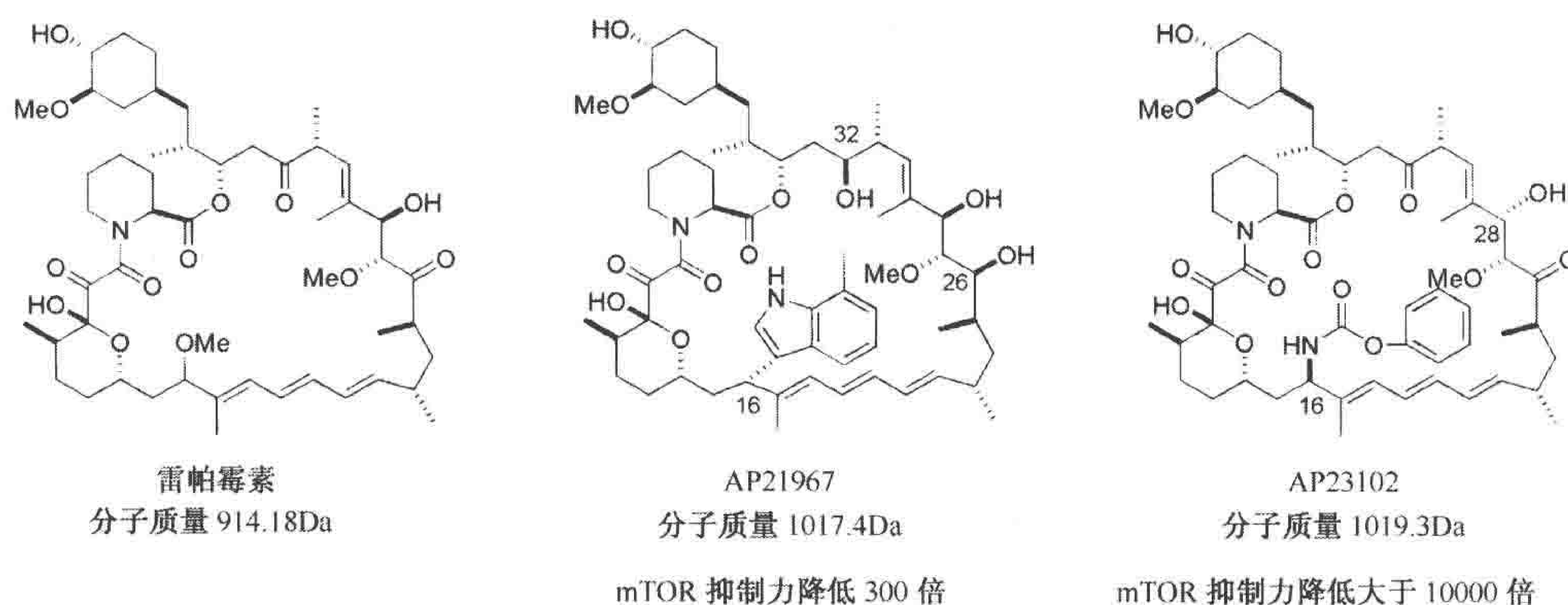



图 2. 用于诱导基因表达的雷帕霉素及其类似物的化学结构。AP21967 的 3 个数字标明的位点和 AP23102 的 2 个数字标明的位点显示这些位点的变化同雷帕霉素有关。图中也显示了它们的分子质量及雷帕霉素类似物同雷帕霉素相比的对哺乳动物的抗增殖活性。

雷帕霉素体系仅仅只用人类蛋白质来建立，以使其在临床应用中免疫抑制的潜能减到最少。DNA 结合区域为 ZFHD1，是一个具有新的 DNA 识别特异性的复合性 DNA

结合区域（Pomerantz 1995）。ZFHD1 由来自于人转录因子 Zif268 的两个锌指区域构成，并连接到来自于人转录因子 Oct-1 的一个同源异型结构域上。ZFHD1 以高亲和性和特异性与一个特异的复合性 DNA 结合序列相结合，而不是同 Zif268 或 Oct-1 的结合位点相结合。典型的情况是多种复制的 ZFHD1 结合位点均位于靶基因的上游，以便获取强的基因转录激活。激活区包含来源于人 NF-κB 的 p65 亚基羧基端的 191 氨基酸（Schmitz and Baeurle 1991），它在操作上优于常用的人类疱疹病毒 VP16 激活区域（River et al. 1996；Natesan et al. 1999）。

## 体外实验的预期结果

图 3A 显示以 AP21967、AP23102 或者雷帕霉素分别作用于稳定转染表达一种分泌性碱性磷酸酶基因及可调节的转录因子的载体的纤维肉瘤 HT1080 细胞，当分别增加这三种药物的剂量时对报道基因表达的影响。在二聚体药物不存在的情况下，靶基因的表达是不可见的，10～30nmol/L 的药物浓度所产生的诱导作用最强，而 AP21967 的剂量通常需达到约为 AP23102 或者雷帕霉素的 3 倍才能得到相同的诱导效果。一般加用二聚体药物后 24～48h 诱导作用是最大的。基因表达的衰减动力学依赖于很多因素，包括转录复合物、mRNA 及靶蛋白的半衰期。基因表达的显著升高可持续许多天。如果期望发生长期诱导，我们建议每次更换培养基的时候（如 3d 一次）补充二聚体。

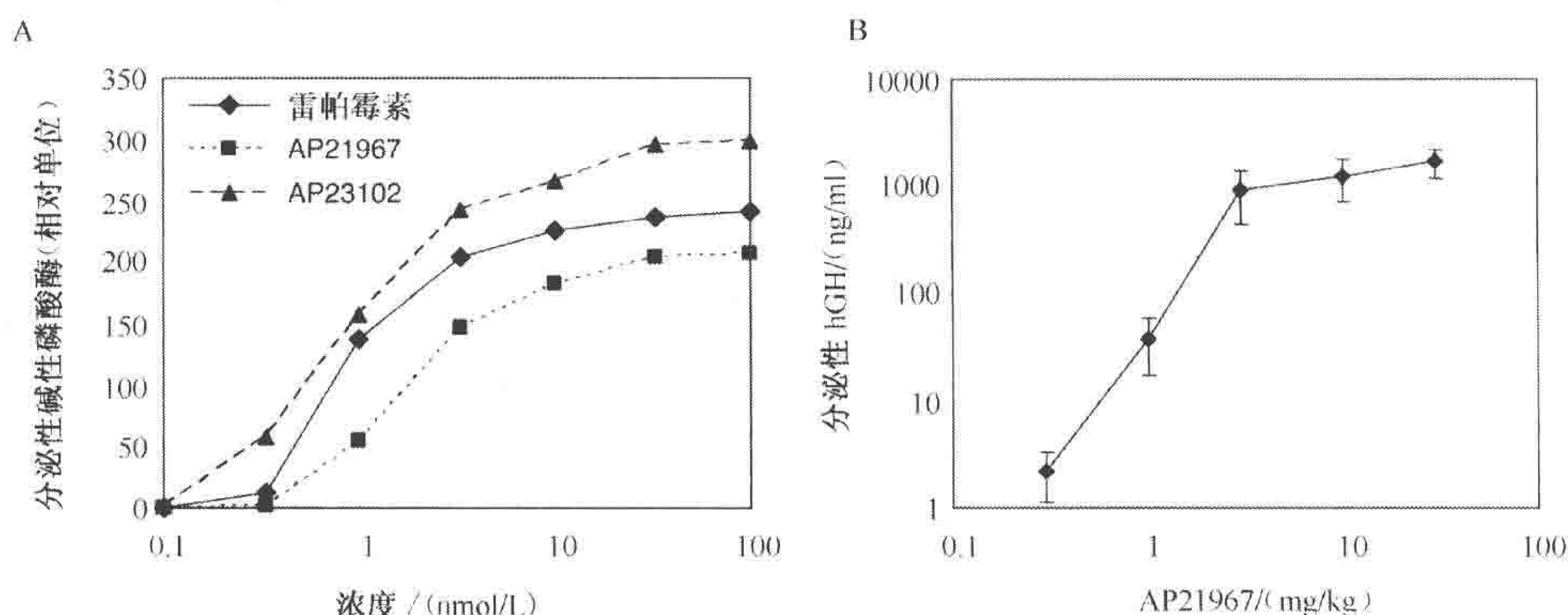



图 3．二聚体调控基因表达的举例。A. 体外研究；B. 体内研究，方法见正文中。

## 体内实验的预期结果

图 3B 显示以不同剂量的 AP21967 作用后的小鼠血清中人生长激素（hGH）的水平。将小鼠进行转导，高压灌注法注射 DNA 入尾静脉。3mg/kg 以上剂量的 AP21967 可诱导 hGH 的水平超过基线水平的 1 万倍。血清中 hGH 的水平在注射 AP21967 24h 后检测。在我们的实验中，3～10mg/kg 剂量的 AP21967 腹腔内给药于小鼠的诱导反应最强，而低 30 倍的剂量给药后诱导反应很弱或者无反应。诱导发应的动力学及衰减动力学依赖于很多因素，但在一般情况下在二聚体药物注射后 24～48h 表达最强。衰减动力学由二聚体药物、转录复合物、mRNA 及靶蛋白的半衰期决定，无论哪个都是由最长的决定（Clackson 2000）。通常单剂量二聚体药物都会在许多天内持续诱导表达。

## 方案1

# 二聚体介导的体外基因表达调控

本方案描述了雷帕霉素或其类似物诱导基因表达所需载体的制备以及在体外诱导基因表达的过程。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

本节描述的已构建的载体及雷帕霉素二聚体均来自 ARIAD 公司的 ARGENT 转录调控质粒试剂盒（www. ariad. com/regulationkits）适宜靶细胞生长的培养基

二聚体（本流程描述的二聚体的化学结构如图 2 所示）

雷帕霉素类似物 AP21967 和 AP23102（ARIAD 公司）

雷帕霉素（Sigma-Aldrich 公司，目录号 R0395）

通常此化合物为干粉，应在密封容器中避光保存于－20℃。在体外实验中，该化合物应如方法中所述以无水乙醇溶解。

乙醇（如 AAPER 公司乙醇，纯度 100%），冰冷的

构建的质粒（常用于建立二聚体诱导表达的载体质粒构建图谱如图 4 所示）

转录因子质粒：$pC_4N_2$-$R_HS$/ZF3

质粒载体驱动受控转录因子的表达（图 4，上），包含一个 CMV 增强子/启动子（C），用于驱动双顺反子转录的融合蛋白：

- 一个活化的融合区域（$R_HS$），由人 FRAP（$R_H$）的 FRB 片段构成，融合到源于人 NF-κB 亚单位 p65 的活化区域（S；第 361～551 位氨基酸）。FRB 区域由 FRAP 的 2021～2113 位氨基酸组成，合并 T2098L 突变以便结合雷帕霉素类似物。
- 一个 DBD 融合区域（ZF3）由 ZFHD1 DBD（Z）和三个串联重复的人 FKBP12（F3）拷贝序列组成。

两种/融合蛋白均包含一段氨基酸端核定位序列（N2，源自人 *c-myc* 基因）。两个编码区由脑心肌炎病毒的一段核糖体结合序列（IRES）隔开，以利第二个顺反子（ZF3）的翻译，再连接一段源于兔 β-珠蛋白的 3′非翻译区（UTR），包含其终末内含子和 polyA 信号。

转录因子融合的适宜结构应能使 ZFHD1 融合至三个串联重复的人 FKBP12 区域和 p65 的活化区域融合至一个单一的 FRB 区域。理论上该结构可使每个 DNA 结合位点募集最多 3 个活化区域（图 1）。

靶基因质粒：$pZ_{12}I$-PL-2

被调控基因的编码区插入靶基因载体（图 4，下）。载体包含 12 个 ZFHD1 结合位点和一个极小的人 IL-2 基因启动子（$Z_{12}I$），多接头（PL）的上游为 3′UTR 包含一个源于 SV40 晚期基因（－2）的多聚腺苷酸化信号。多接头由以下的限制性位点组成：*Hin*dIII、*Pst*I、*Eco*RI、*Spe*I、*Bgl*II、*Cla*I。

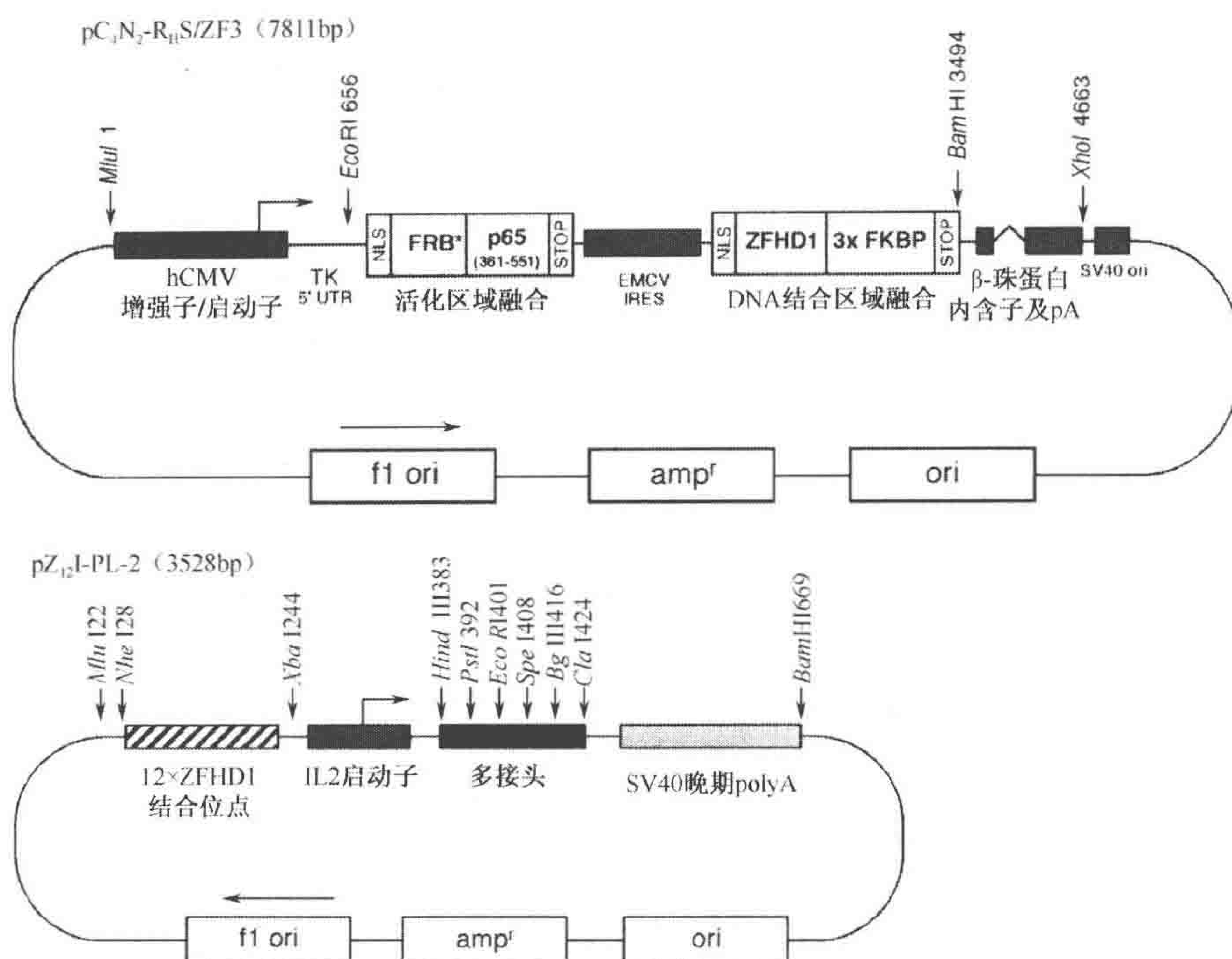



图 4．二聚体诱导基因表达的构建图谱。（上）转录因子表达质粒 $pC_4N_2$-$R_HS$/ZF3；（下）靶基因质粒 $pZ_{12}$I-PL-2。缩略语的解释见文中材料部分。

对照的靶基因质粒：$pZ_{12}$I-hGH-2

阳性对照载体包含作为 759bp 的 *Hin*dIII- *Eco*RI 酶切片段插入 $pZ_{12}$I-PL-2 的 hGH 的 cDNA。

靶细胞

## 仪器

离心管或玻璃瓶

旋涡混合器

# 方法

## 载体准备

载体是运用标准的克隆技术由材料部分所示的起始构造构建而成。

1. 将待调控基因的编码区插入到 $pZ_{12}$I-PL-2 的多接头处而构建靶基因载体。这样可使它的表达受二聚体调控的转录因子的调控。

   或者，将 $Z_{12}$I 调控区从 $pZ_{12}$I-PL-2 上移除（如运用 5′ *Mlu*I 或 *Nhe*I 和 3′ *Hin*dIII、*Pst*I、*Eco*RI、*Spe*I、*Bgl*II、*Cla*I 酶切位点），并将定位于不同的载体的感兴趣的基因的编码区插入它的上游。载体也必须提供适宜的 3′UTR。

2. 必要时可优化转录因子载体。

在一定的情况下，有必要以其他增强子替换帮助待调控的转录因子表达的 CMV 增强子，如在靶细胞群体中更活跃的增强子。方法是以所选增强子和 5′UTR 序列替换 $pC_4N_2\text{-}R_HS$/ZF3 的 *Mlu*I-*Eco*RI 片段。

3. 必要时对载体组分进行亚克隆。

在某些应用中，期望将待调控的转录因子和靶基因盒亚克隆到供选择的载体支架中，如 AAV、腺病毒、慢病毒、反转录病毒载体或包含有选择标记的载体。为达这一目的，可在适当的情况下将完整的转录因子表达盒（如运用 *Mlu*I-*Xho*I 的位点）或仅仅是编码区（如 *Eco*RI-*Bam*HI）转移到另一个载体中。完整的靶基因盒能运用邻近 5′ *Mlu*I 或 *Nhe*I 和 3′ *Bam*HI 位点进行转移。

转录因子和靶基因盒也能合并到单一的载体中。例如，在相同的方向靶基因盒直接克隆到转录因子盒的下游的载体已成功构建并通过共转导分离的载体而保留紧密的调控水平（Rivera et al. 2005）。

## 将载体引入靶细胞

4. 运用适宜的技术将转录因子和靶基因载体引入感兴趣的靶细胞中。

**瞬时转染**

a. 起始时将转录因子和靶基因质粒以 2∶1 的比率引入。

b. 如果转录因子的表达水平太高，瞬时转染的靶基因的转录能够减少或者被压制（Natesan et al. 1997）。

在给定的条件下有可能需要进一步优化质粒的比率，用 DNA 携带引入时要限制转录因子质粒的数量。

**稳定转染**

当需要稳定细胞株时（一般不出现压制的情况，见 Natesan et al. 1997），引入的靶基因表达水平必须同融合的活化区域表达水平一致。驱动转录因子融合表达的增强子必须根据被转导的细胞进行优化。CMV 增强子普遍适用于这一目的，但在某些细胞类型中，选择性的增强子可能更适宜，可能需要克隆到转录因子载体中（见上面的步骤 2）。为建立包含转录因子和靶基因质粒的稳定细胞株，我们推荐将它们依次转入细胞。

a. 稳定地整合转录因子载体质粒到宿主细胞中。

b. 通过瞬时转染感兴趣的靶基因或易检测的靶基因筛选单克隆（如 $pZ_{12}$I-hGH-2）。

c. 选择背景最低且对雷帕霉素或 AP21967 诱导的依赖性最高的克隆。

d. 稳定地整合靶基因质粒到宿主细胞中。

e. 筛选背景最低且二聚体药物依赖性靶基因表达水平最高的单一的克隆。

转录因子和靶基因质粒必须同含有不同的选择标记的载体共转染或者亚克隆到含有选择标记的载体中（见上面的步骤 3）。

**病毒载体感染**

将适宜的病毒载体转导到细胞内，如反转录病毒载体（Pollock et al. 2000）。转录因子反转录版本和靶基因载体信息均可从 ARIAD（www.ariad.com/regulationkits）获得。

5. 准备二聚体。给出的例子是 AP21967。雷帕霉素（914Da）或者 AP23102（1019.3Da）能以相似的方法准备或储存。
   a. 准备冻干的 AP21967（分子质量 1017.4Da）在体外使用，加入冰冻的无水乙醇到干粉中配成 1mmol/L 的溶液（如溶解 250μg AP21967 用 246μl 无水乙醇）。密封并间歇地旋涡振荡几分钟使化合物溶解。溶解时于冰上操作使其蒸发最少。
   b. 将二聚体储存液避光保存于－20℃于玻璃瓶或小离心管。以相同的方法保存其他乙醇稀释液。以这种方法储存的试剂至少在一年内是稳定的。

      在工作台上，将乙醇溶液置于冰上，每次打开的时间尽可能短，防止药物挥发和由此所致的浓度变化。

      在大多数应用中，AP21967 是我们推荐的二聚体，因为它同雷帕霉素相比抗增殖活性是减弱的。

   c. 准备含期望浓度二聚体的培养基通过直接从乙醇储存液中取二聚体药物加入或在使用前以培养基多次稀释。

      在后一种情况下，为保证在（水）培养基中完全溶解，最高浓度不能超过 5μmol/L。在另一种情况下，加到哺乳动物细胞的培养基中的乙醇终浓度必须保持在 0.5%以下（200 倍稀释 100%的乙醇溶液）以防止溶剂对细胞的有害作用。

6. 以含二聚体的培养液替换靶细胞的培养基。

   单次给以二聚体药物通常足够诱导 3d 的表达。为了长期的实验，每次细胞换液时（如每 3 天一次）换用含二聚体的新鲜培养液。

7. 确定表达的剂量反应和动力学。在起始的实验中，检测宽范围的浓度（如 0.01～1000nmol/L）的 AP21967 得到完全的剂量反应图谱（见疑难解答）。

## 疑难解答

问题：体外诱导的表达很弱或者无法检测到。

解决方法：在瞬时转染中，有必要转染后留出一定的时间让转录因子聚集到足够的水平（如 24h）。可诱导的 hGH 质粒（pZ$_{12}$I-hGH-2）作为对照来检测转录因子载体及转染程序。hGH 可用 Roche 公司（1 585 878）的试剂盒定量。用 Western 杂交检测转录因子融合蛋白的表达。抗-p65 的抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-372）可用于检测 R$_H$S 活化区域融合蛋白（约 48kDa）。这些蛋白质达到足够的水平对诱导效果是最为重要的。如果 R$_H$S 表达水平低，则试着增加 pC$_4$N$_2$-R$_H$S/ZF3 载体导入细胞的数目（ZF3 DBD 融合蛋白水平通常低得难以检测，因为它的表达是由 IRES 序列驱动的）。

问题：基础（未诱导时）表达高。

解决方法：减少导入细胞的载体浓度。在稳定转染中，测定单个的克隆来证实表现紧密的表达调控的克隆。

**方案 2**

# 二聚体介导的体内基因表达调控

本方案描述了雷帕霉素或其类似物在体内如何诱导基因表达。

## 材料

**注意**：标有＜ !＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

二聚体（本节描述的二聚体的化学结构如图 3 所示）
雷帕霉素类似物 AP21967 和 AP23102（ARIAD 公司）
雷帕霉素（Sigma-Aldrich 公司，目录号 R0395）
通常此化合物为干粉，应在密封容器中避光保存于－20℃。
*N*，*N*-二甲基乙酰胺＜ !＞（DMA；如 Sigma-Aldrich 公司 D5511）
小鼠
构建的质粒（见方案 1）
聚乙二醇 400＜ !＞（PEG-400 ；如 J. T. Baker 公司 U216-07）
聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯（Tween-80；如 Sigma-Aldrich 公司 P1754）

### 仪器

玻璃瓶
旋涡混合器

## 方法

1. 运用适当的技术将转录因子和靶基因载体导入实验动物体内。例如，肌肉注射给药分离的 AAV 载体（Rivera et al. 1999，2005）。
2. 准备将腹（膜）腔内给药入小鼠的二聚体药物。给出的例子是 AP21967。雷帕霉素的配制、储存及给药是相同的。
   a. 如果是 10mg/kg 的剂量，将 AP21967 溶于 DMA 达 10mg/kg 浓度。旋涡振荡几分钟至化合物溶解。该化合物储存液可于－20℃保存至 2 个月。

      若给以低于 10mg/kg 的剂量，可用更稀的溶于 DMA 的 AP21967 的储存液。在大多数应用中，AP21967 是我们推荐的二聚体，因为它同雷帕霉素相比抗增殖活性是减弱的（图 3）。

   b. 准备一种 PEG-400 和 Tween80 比率为 9：1 的储存液。

      该储存液能事先准备，在常温下可保存至一个月。

   c. 在使用前短时间内，混合等量的 AP21967/DMA 和 PEG/Tween 使溶液中 AP21967 剂量达 5mg/kg。旋涡振荡使混合均匀。

3. 将适量的 5mg/kg AP21967 溶液以 2ml/kg 的剂量腹（膜）腔内给药，如以 10mg/kg 的剂量入 20g 的小鼠，腹（膜）腔内给药 40μl。

 此种配方只适用于腹（膜）腔内给药，由于 DMA 对小鼠有毒性，我们建议在开始研究之前以手动方法凭经验注射（在非转导的动物上）。手动剂量动物应该一直作为对照之一。

4. 确定剂量反应和表达的动力学。在起始实验中，测量 AP21967 在一个范围内的浓度（如 0.3～10mg/kg）找到最有效的浓度以便使用。

 在目前为止的研究中，AP21967 腹（膜）腔内给药至 30mg/kg 对动物没有毒性。起始研究应显示用单一剂量的二聚体所致的诱导作用和衰减动力学（见疑难解答）。

## 疑难解答

问题：诱导的表达很弱或者无法检测到。

解决方法：在将载体用于体内研究之前，先检测载体在体外诱导表达的能力。尝试通过增大 $pC_4N_2$-$R_H$S/ZF3 载体的剂量来增加转录因子融合蛋白的表达水平。仔细检查二聚体的配法以确保到达靶细胞的药物达足够的水平。用可诱导的 hGH 质粒（$pZ_{12}$I-hGH-2）作为对照（如方案 1 疑难解答）

问题：基础（未诱导时）表达高。

解决方法：减少每种载体的剂量。

## 参 考 文 献


Chen J., Zheng X.F., Brown E.J., and Schreiber S.L. 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 4947–4951.

Choi J., Chen J., Schreiber S.L., and Clardy J. 1996. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273:** 239–242.

Clackson T. Regulated gene expression systems. 2000. *Gene Ther.* **7:** 120–125.

Ho S.N., Biggar S.R., Spencer D.M., Schreiber S.L., and Crabtree G.R. 1996. Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature* **382:** 822–826.

Magari S.R., Rivera V.M., Iuliucci J.D., Gilman M., and Cerasoli F., Jr. 1997. Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. *J. Clin. Invest.* **100:** 2865–2872.

Natesan S., Rivera V.M., Molinari E., and Gilman M. 1997. Transcriptional squelching re-examined. *Nature* **390:** 349–350.

Natesan S., Molinari E., Rivera V.M., Rickles R., and Gilman M. 1999. A general strategy to enhance the potency of chimeric transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 13898–13903.

Pollock R. and Clackson T. 2002. Dimerizer-regulated gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13:** 459–467.

Pollock R., Giel M., Linher K., and Clackson T. 2002. Regulation of endogenous gene expression with a small-molecule dimerizer. *Nat. Biotechnol.* **20:** 729–733.

Pollock R., Issner R., Zoller K., Natesan S., Rivera V.M., and Clackson T. 2000. Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 13221–13226.

Pomerantz J.L., Sharp P.A., and Pabo C.O. 1995. Structure-based design of transcription factors. *Science* **267:** 93–96.

Rivera V.M., Ye X., Courage N.L., Sachar J., Cerasoli F., Jr., Wilson J.M., and Gilman M. 1999. Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 8657–8662.

Rivera V.M., Gao G.P., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W., Clackson T., and Wilson J.M. 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105:** 1424–1430.

Rivera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cerasoli F., Jr., Holt D.A., and Gilman M. 1996. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Med.* **2:** 1028–1032.

Schmitz M.L. and Baeuerle P.A. 1991. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-κB. *EMBO J.* **10:** 3805–3817.

Spencer D.M., Wandless T.J., Schreiber S.L., and Crabtree G.R. 1993. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* **262:** 1019–1024.

# 第六十四章　RheoSwitch 系统：基于蜕皮激素受体的可被合成小分子配体诱导的高灵敏基因调节系统

Prasnna Kumar 和 Anand Katakam
RheoGene，Inc.，Norristown，Pennsylvania 19403
张文军　译



## 摘要

RheoSwitch 系统是蜕皮激素受体基础上高效率的基因调节体系，该系统被合成的小分子配体激活。受体由蜕皮激素受体蛋白和 RXR 蛋白以双杂交的形式异二聚体化组成，在配体存在下受体从相应的启动子激活转录。RheoSwitch 系统在动物细胞、酵母和植物中行使功能。

RheoSwitch 系统的优点包括卓越的安全性，对哺乳动物细胞无其他效应，二酰基肼配体的高灵敏性和高生物利用度。配体具有药理学惰性。因为配体水溶性低，体内应用时采用口服或注射给药（配体）。RheoSwitch 系统有剂量依赖性，适应广泛的配体的浓度。该系统具有很大的灵活性，可以制成多载体或单载体形式，可合并形成腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒和慢病毒载体。诱导启动子的指令形成不同形式的系统，提供所希望水平的转基因表达的调节。这些特点使 RheoSwitch 系统用于细胞和基因治疗应用，细胞内通路的基础研究和携带精确调控转基因的转基因动物是理想的。近来，多种病毒载体中的 RheoSwitch 系统已开发出来，载体的广泛体内评价正在进行中。

## 引言

对哺乳动物细胞基因调控系统早期版本利用内源启动子，这些内源启动子被热休克（蛋白）或特定的金属离子调控，但这些系统对细胞的多种功能有影响。接下来的哺乳

动物细胞基因调控系统使用异源或者高质量的工程蛋白质，目标在减少多效应的影响和调节驱动与配体反应的感兴趣基因的启动子。这种系统之一是建立在蜕皮激素（EcR）受体基础上的，昆虫的核受体能接合到蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮（20-hydroxy-ecdysone）上，激活包括蜕皮基因的几个基因的转录（Palli et al. 2005）。Drosophila EcR 起初用来去开发哺乳动物细胞基因调节系统，它被类固醇（Christopherson et al. 1992）激活。再后来，使用 Drosophila EcR 和人类 RXR-α 的改进的系统被开发（No et al 1996）。另一个调节系统是建立在 Bombyx mori EcR 基础上的，Bombyx mori EcR 与内源性 RXR 二聚化（Suhr et al. 1998）。

RheoSwitch 系统，由 RheoGene 公司建立，使用来自 *Choristoneura fumiferana* 诱变处理的蜕皮激素（Palli et al . 2003）。它由两个核受体以双杂交的形式组成，核受体可以被合成的小分子配体激活。受体蛋白的配体结合部分是融合蛋白，是由昆虫 EcR 核受体（为类固醇受体的一员）融合有酵母 GAL4（一种真核生长转录因子）DNA 结合结构域而构成的。另一个受体组分是融合蛋白，由昆虫和哺乳动物序列杂合的 RXR（视黄素 X 受体）的 EF 结构域，融合有病毒激活结构域 VP16（是一种常用的易于研究的病毒转录子）组成。两个融合蛋白受体在组成型启动子控制下表达。结合到 Gal4-EcR 的配体增强了它与 VP16-RXR 的异二聚体化反应，也激活异二聚体作为有效的转录因子去行使功能。作为转录因子的融合蛋白从包含有 Gal4 结合位点的诱导型启动子诱导基因表达（图 1，见彩版）。

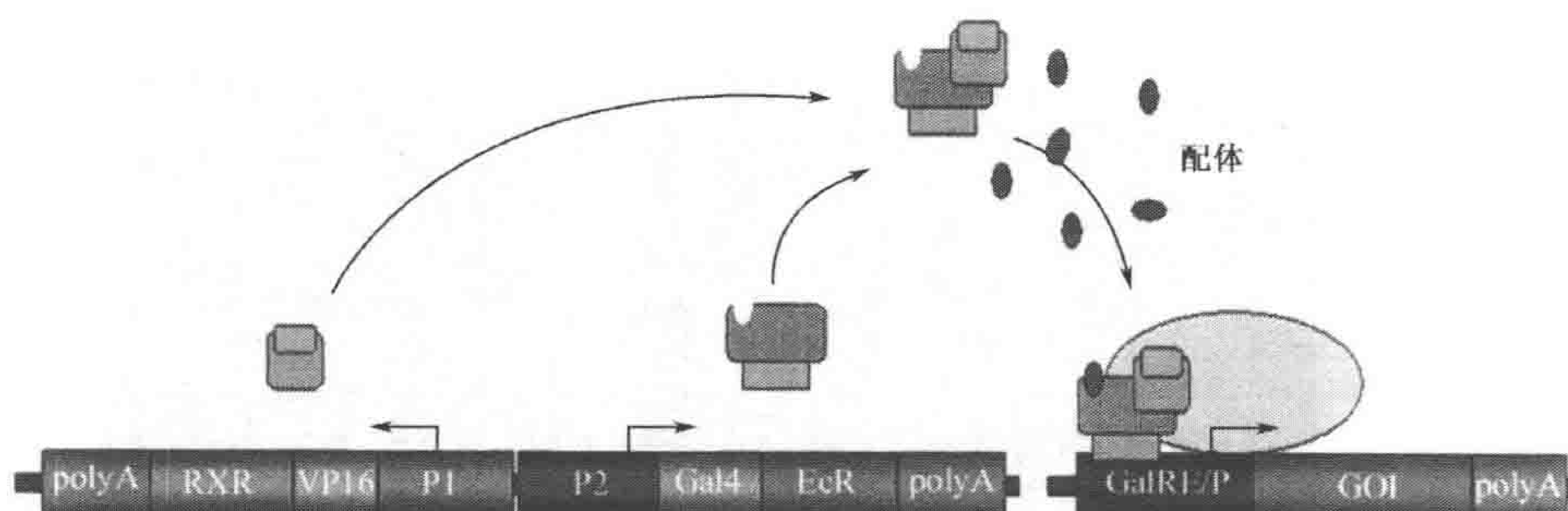



图 1. RheoSwitch 系统双载体形式：两个受体组分在组成型启动子下表达（P1 和 P2）。配体结合到 EcR 增强了异源二聚化也激活了受体从可诱导的启动子上诱导基因的转录。

可诱导的启动子由 5 个重复的 Gal4 插入上游小的启动子中组成，小启动子来源于自然产生的或者合成的序列。多种诱导型启动子形成了不同类型的 RheoSwitch 系统。基因表达水平可存在不同，即可在启动子的严格控制下呈本底水平表达，当与启动子作用的配体缺乏时，由于启动子的轻度开放可诱导受此类启动子严格控制的基因呈中等水平表达，但是也可以诱导基因的高水平表达，这可以应用于基因表达绝对数量具有重要作用的研究中。

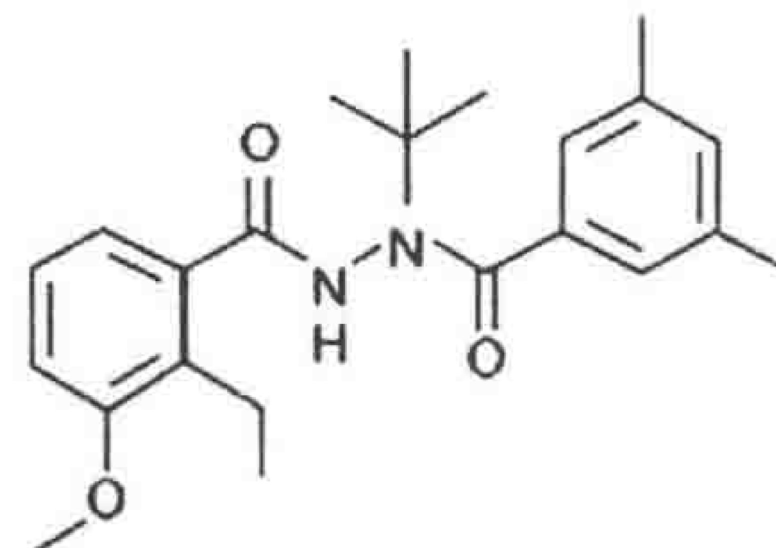



图 2. 配体 RSL1 的结构。

## 配体

用来激活 RheoSwitch 系统的配体是二酰基肼类化

合物家族的衍生物（Dhadialla et al . 1998），一些配体，如 RSL1（图 2），已通过39 500个人类的基因序列的微阵列分析评估，评估其对基因表达谱的影响。内源基因的表达谱几乎没有改变。进行的二酰基肼配体毒理研究显示，配体对啮齿动物没有生物毒性。针对于某种二酰基肼配体在啮齿动物中的研究，证明了配体能穿过血脑屏障并且能激活基因在脑部的表达。

## EcR 突变和 RheoPlex 系统

为了确保受体对配体有高灵敏性和选择性，EcR 配体结合结构域已进行过广泛的突变（Kumar et al. 2002，2004）。目前，RheoSwitch 系统的标准版本中受体在两个位置（V390I 和 Y410E）有突变。它被 pmol/L 浓度的配体，如 RSL1，激活。受体只受二酰基肼配体的激活，对蜕皮激素完全没有反应的突变也进行过研究。

在 RheoPlex 系统中，同样的细胞或者微生物中多基因能被独立地调节。这个系统的第一个版本使用两个 EcR 突变：突变 1 只对配体 1 反应，突变 2 只对配体 2 反应。EcR 突变体 1 和 2 的配体结构域与两个不同的 DNA 结合结构域（DBD）融合，这些融合蛋白使用相同的异源二聚体组分 VP16-RXR。响应它们的同源配体，EcR 突变 1 和 2 分别从两个可诱导的启动子激活转录，启动子对于相对应的 DBD 包含相近的结合位点，没有交叉激活。图 3（见彩版）表示在共转染的实验中两个基因独立地被两个不同的配体激活，（激活的基因）用免疫荧光法进行基因检测。

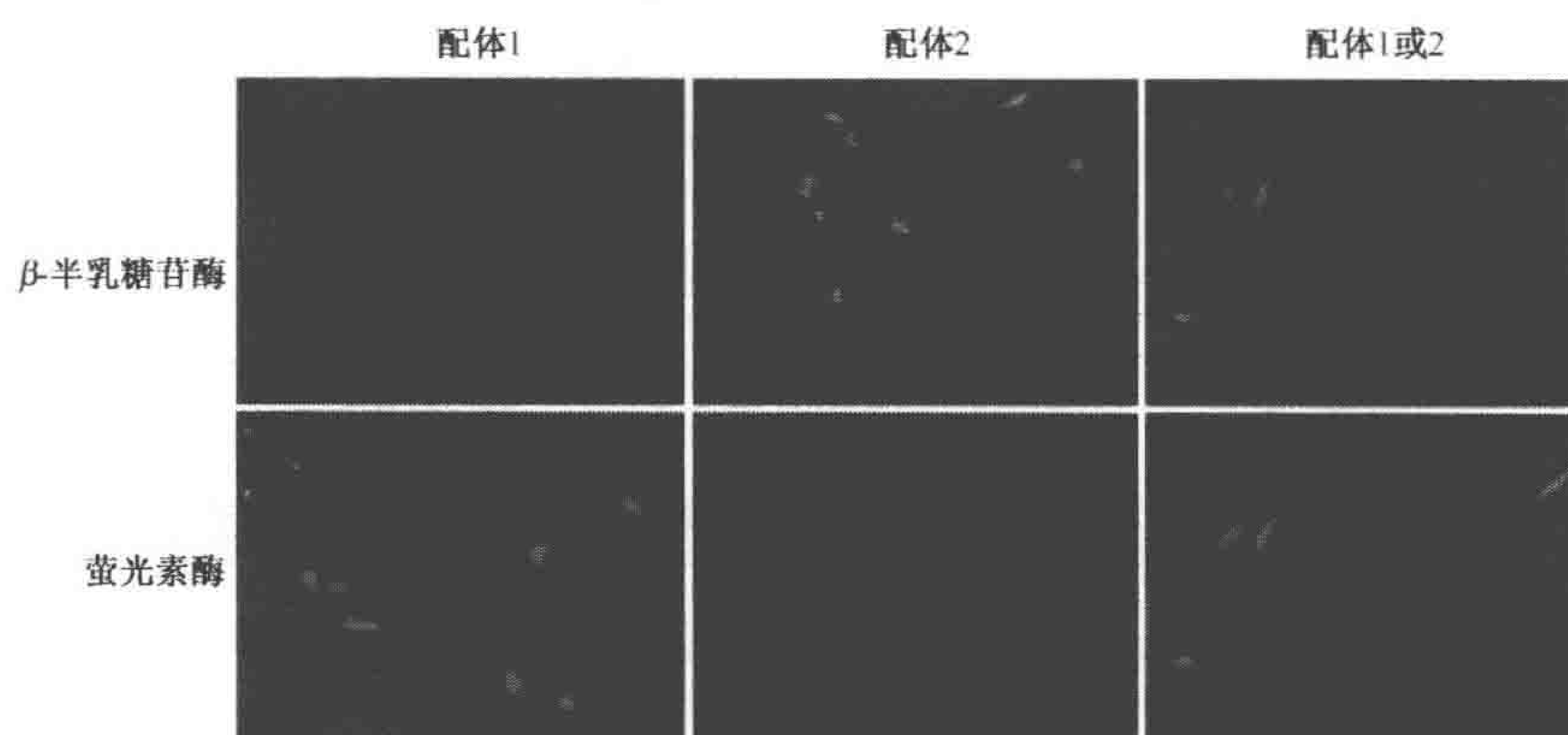



图 3．RheoPlex 系统中萤火虫萤光素酶基因和 *lacZ* 基因和分别被两个配体的独立调节。上面的平面代表着来自相同的细胞系的两组细胞在对 β-半乳糖苷酶和萤光素酶进行免疫荧光照射后拍的照片。配体 1 只诱导萤光素酶，配体 2 只诱导 β-半乳糖苷酶，配体 1 和 2 加起来可诱导两种蛋白质。

## 载体构建形式（vector format）

RheoSwitch 系统已被装成双载体和单载体系统。图 1 表示双载体系统，受体载体从组成型启动子表达两个受体组分。诱导型的表达载体包括诱导型的启动子和感兴趣的基因。单载体可直接用于质粒转染或并入病毒载体。为构建包含嵌入的载体的稳定的细胞株，用于质粒转染的单载体或者双载体系统包含有选择性标记，如潮霉素和新霉素。

构建受配体调节的转基因的转基因鼠的系统模型正在进行评估。在设计的转染载体中，为减少总的细胞的大小，两个受体部分从单一的组成型启动子上作为一个双顺反子表达。RheoSwitch 系统已并入腺病毒载体、腺相关病毒载体、反转录病毒和慢病毒载体。腺病毒、反转录病毒和慢病毒载体是双杂交形式，能够提供大约 3kb 感兴趣的基因编码序列。腺相关病毒载体是双杂交的形式，表达相对小的基因（<900bp）。除此，单受体的系统已被开发出来，它由单独的融合蛋白组成。融合蛋白的激活结构域是 VP16、Gal4-DBD、EcR 的 DEF 结构域结合配体。融合蛋白从可诱导的启动子上激活转录。在腺相关病毒载体中单受体系统能提供少于 2kb 的转录基因。近来，病毒载体已被开发并进行了体内、体外的评估。进一步的体内评估正在进行中。

使用组织特异性组成型启动子表达受体组分，RheoSwitch 系统能被限定到特定类型的细胞中。除此 VP16 激活结构域，其他的哺乳动物来源的激活结构域已在不同版本的 RheoSwitch 系统中使用（Karzenowski et al. 2005）。表 1 列举了哺乳动物细胞株及系统中使用的主要细胞株。

**表 1. 哺乳动物的细胞株和 RheoSwitch 系统已经成功应用的主要的细胞株**

| 细胞株 | 描述 |
| --- | --- |
| NIH-3T3 | 小鼠胚胎成纤维细胞 |
| B16 | 小鼠皮肤黑色素瘤细胞 |
| C17.2 | 小鼠神经干细胞 |
| DC2.4 | 小鼠树突状细胞 |
| CHO | 中国仓鼠卵母细胞 |
| PC-12 | 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 |
| CV-1 | 猴肾脏成纤维细胞 |
| A549 | 人肺癌细胞 |
| HCT 116 | 人结肠癌细胞 |
| HeLa | 人宫颈癌细胞 |
| HepG2 | 人肝癌细胞 |
| MCF-7 | 人乳腺癌 |
| HEK-293 | 人胚肾细胞 |
| HT1080 | 人纤维肉瘤细胞 |
| LAPC4 | 人前列腺癌细胞 |
| 原代细胞 | |
| 小鼠胚胎干细胞 | |
| 大鼠骨髓基质细胞 | |
| 人和鼠的 T 细胞 | |
| 人和鼠的造血干细胞 | |
| 骨髓间充质干细胞 | |
| 大鼠主动脉平滑肌细胞 | |

## 可诱导的表达载体

RheoSwitch 系统中，诱导表达载体包含多克隆位点，刚好在可诱导启动子下游。使用标准的分子克隆方法，感兴趣的基因可以插入任何限制性内切核酸酶位点（Sambrook and Russell 2001）。为有效地转录，在转录起始位点与多克隆位点之间要求有最少的 5′UTR（非转录区）。然而，对于感兴趣的基因 5′端的编码序列，要有 Kozak 序列

(**GCCACCATG**G，在这里黑体字母 ATG 是起始的甲硫氨酸的密码子)，相对于起始位点，这一序列中最重要的碱基是在-3 位的嘌呤碱和在＋4 位的 G 。

### RheoSwitch 系统在体内的应用

RheoSwitch 系统能通过病毒或非病毒载体导入体内。对于病毒载体导入系统，RheoSwitch 载体导入的形式为一段预先构建好的序列插入到商业的或自己拥有的腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒和慢病毒载体。简短地说，预期数目的纯化的病毒颗粒，可静脉注入或者是直接注入靶组织内。溶解到 DMSO 的配体通过静脉注射给药。载体导入后配体给药的最佳时间依赖于使用的病毒载体。对于小鼠，起始的给药剂量为 50mg/kg 体重，DMSO 中配体浓度为 20mg/ml (重量大约为 20g 的小鼠近似用 50μl 的 DMSO，约 1mg 的剂量)。对于连续性基因的表达，配体能通过喂养动物给药。在所希望的时间点对基因表达进行了评估，对于 AAV 载体，基因组从单链 DNA 到双链 DNA 进行转变需要 3～4 周的时间。对于非病毒体内转移方法，如电转移法，在第三十八章中描述。

### 联系信息和营销伙伴

纽伦生物技术 (NEB) 销售双载体版本的 RheoSwitch 系统。这个系统中，可诱导的启动子提供极其紧密的转基因的调节。受体载体命名为 pNEBR-X1。感兴趣基因高表达水平的载体和一些整合受体基因组的细胞株也可从 NEB 得到。关于产品的更多的细节可访问 NEB 网站 www.neb.com，对有特殊研究需要、建立伙伴关系、双方合作和许可用于治疗开发利用技术，访问 www.rheogene.com。

## 方案

## 合成的小分子配体 RSL1 诱导的体外基因调节

本方案描述了使用 RheoSwitch 系统对培养细胞的转染，在这里基因被一个合成的小分子配体 RSL1 调控。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

氨苄青霉素 (100mg/ml 水溶液) <!>
小牛血清 (Invitrogen)
要转染的细胞
二甲基亚砜 (DMSO；Sigma-Aldrich) <!>
配体：RSL1 (5mmol/L 在 DMSO 中，室温下稳定，MW 382.5) (New England BioLabs)

脂质体 2000（Invitrogen）
荧光检测系统（Bright-Glo；Promega）
核酸
可诱导的表达载体：pNEBR-X1（New England BioLabs）
标准质粒：pRL-CMV（最佳的，见步骤 2a）（Promega）
受体载体：pNEBR-R1（New England BioLabs）

细菌（XL1-Blue 或者其他的）含有质粒，培养在 LB 培养基中，加 100μg/ml 的氨苄青霉素。用于转染的质粒去内毒素，柱式纯化（如来自 QIAGEN 的质粒抽提小试剂盒）或者 CsCl 梯度方法是合适的。

Opti-MEMI 培养基（Invitrogen）或者无血清培养基
PLB 裂解液（Promega）
TRIZOL 试剂（Invitrogen）或 RNeasy Kit（QIAGEN）

### 仪器

细胞培养板（本例中为 48 孔板），96 孔不透明检测板（VWR 或 Fisher Scientific）
微型离心管（1.7ml）
微盘式冷光仪（Dynex Technologies，Inc.）用于荧光检测
平面振荡器

## 方法

### 转染

RheoSwitch 系统与各种转染试剂是兼容的，包括脂质体 2000（Invitrogen）、FuGENE 6（基因治疗系统）、SuperFect（QIAGEN）、磷酸钙沉淀物。电穿孔和细胞核转染技术（Amaxa Biosystems）能被使用。能在多种细胞培养板（96 孔板、48 孔板、24 孔板）上以较大的规模进行转染。在这里，脂质体 2000 用来在 48 孔板转染细胞，用 pNEBR-R1 作为受体载体，pNEBR-X1 含有虫萤光素酶作为可诱导的表达载体。程序可以根据使用情况修改。

1. 如果使用贴壁细胞，在转染前一天接种细胞，250μl 的培养液不加抗生素，这样在转染的时候细胞的汇合度为 80％～90％。

   在含抗生素的培养基中使用 Lipofectamine 2000 会引起细胞毒性。

2. 根据下面描述的方法准备 6 个孔的转染混合物，重复每个转染实验，统计学分析最后的结果。

   a. 在 1.7ml 微型离心管中，加 160μl 的 Opti-MEMI（或者无血清培养基），加 500ng 受体载体（pNEBR-R1）和 1.5μg 可诱导的表达载体（pNEBR-X1），稀释 RheoSwitch 系统质粒。

   如果需要的话，可以加入由组成型启动子驱动对照报道基因，如海肾萤光素酶或者 lacZ，可以用于在孔之间校正转染效率和检测。加入 50ng 校正质粒到微型离心管中。

b. 在另一个 1.7ml 微型离心管中加 6μl 的 Lipofectamine 2000 到 160μl 的 Opti-MEMI（或者无血清培养基）中。

c. 室温下 5min，合并稀释的 DNA 和稀释后的 Lipofectamine 2000，轻轻搅拌，静置 20min。

3. 每个孔（共 6 个）加入 50μl 的转染混合物。
4. 细胞板拿到培养箱中。

为优化转染效率，对不同的细胞株需要探索最佳的 DNA 的量以及 DNA 与 Lipofectamine 2000 的比例。

## 配体诱导基因的表达

根据要得到的基因诱导水平，如下进行配体浓度试验，决定最佳的配体数量。

5. 5mmol/L RSL1（在 DMSO 中）储存液稀释成为不同的工作液。建议工作液浓度为 0.8、4、20、100、500μmol/L。
6. 在细胞板孔培养液中每组工作液稀释 1000 倍（形成浓度为 0.8、4、20、100 和 500nmol/L RSL1），混匀。准备要求体积的配体培养液。
7. 在转染 4～6h 之后，从转染的细胞板孔移走培养基，加 250μl 的包含不同浓度配体培养液。
8. 细胞板拿到培养箱。

目前的转染混合物不影响配体诱导基因的表达能力，并且，在大多数情况下，没有必要从细胞板孔中移走含有转染混合物的培养液。当进行大量的转染检测时这是特别有用的。在这种情况下，上面的方案可做如下修改。

9. 准备含 2 倍希望浓度的配体培养液（如 0.16nmol/L、8nmol/L、40nmol/L、200nmol/L、1μmol/L RSL1 配体）。
10. 重复转染见前面的步骤 1、2。
11. 接种转染混合物形成 DNA-Lipofectamine 2000 复合物后，从细胞板孔中移走培养液，添加 75μl 的新鲜培养液。
12. 每个细胞板孔分配 50μl 的转染混合物，轻轻振荡细胞培养板（每孔共 125μl 的培养液）。
13. 加 125μl 步骤 9 准备的含 2 倍希望浓度配体的培养液。

配体会被稀释到原始浓度的一半。不需要在步骤 12、13 间培养细胞。

14. 轻轻振荡细胞培养板，拿到培养箱。

## 检测诱导的基因表达

在 mRNA 水平，基因的诱导表达能在配体处理后的几个小时内被检测，或者用一个高灵敏度的方法，如化学发光或者绿色荧光蛋白（GFP），在蛋白质水平检测。配体处理 24h 后，表达量足够大，在 48～72h，表达量达到最大。没有必要更换培养液或添加更多的配体（除非培养液被换掉）。

15. 在 mRNA 水平检测诱导基因，从细胞中分离总的 RNA 然后进行 Northern 杂交，或者反转录 RNA 然后进行实时荧光定量 PCR。用于转染的板的格式根据 RNA 的分离方法选择。分离 RNA，使用 TRIZOL 试剂或 RNeasy Kit。

16. 根据蛋白质是细胞内表达还是分泌型的，能检测蛋白质表达和（或）计数完整的细胞，细胞抽提物，或者细胞培养液，检测方法包括内在荧光蛋白（例如，GFP 和它的功能蛋白，在完整细胞中诱导能被看到），化学发光、Western 杂交、ELISA（酶连免疫反应）和其他的功能检测。通过从细胞板孔中移去培养液准备细胞抽提物，添加与要进行的溶酶产物检测不矛盾的裂解液。对于用在方案中的荧光表达载体，如下检测诱导：

a. 通过添加 100μl 裂解液到细胞板孔溶解细胞，在平板振荡器上振荡 15min。

b. 移取 20μl 溶酶产物到白色不透明 96 孔板中。

c. 分配 50μl 的荧光底物到培养板孔中，然后读取细胞板在微盘式冷光仪下。

样本检测的结果的萤火虫萤光素酶的报告如图 4。

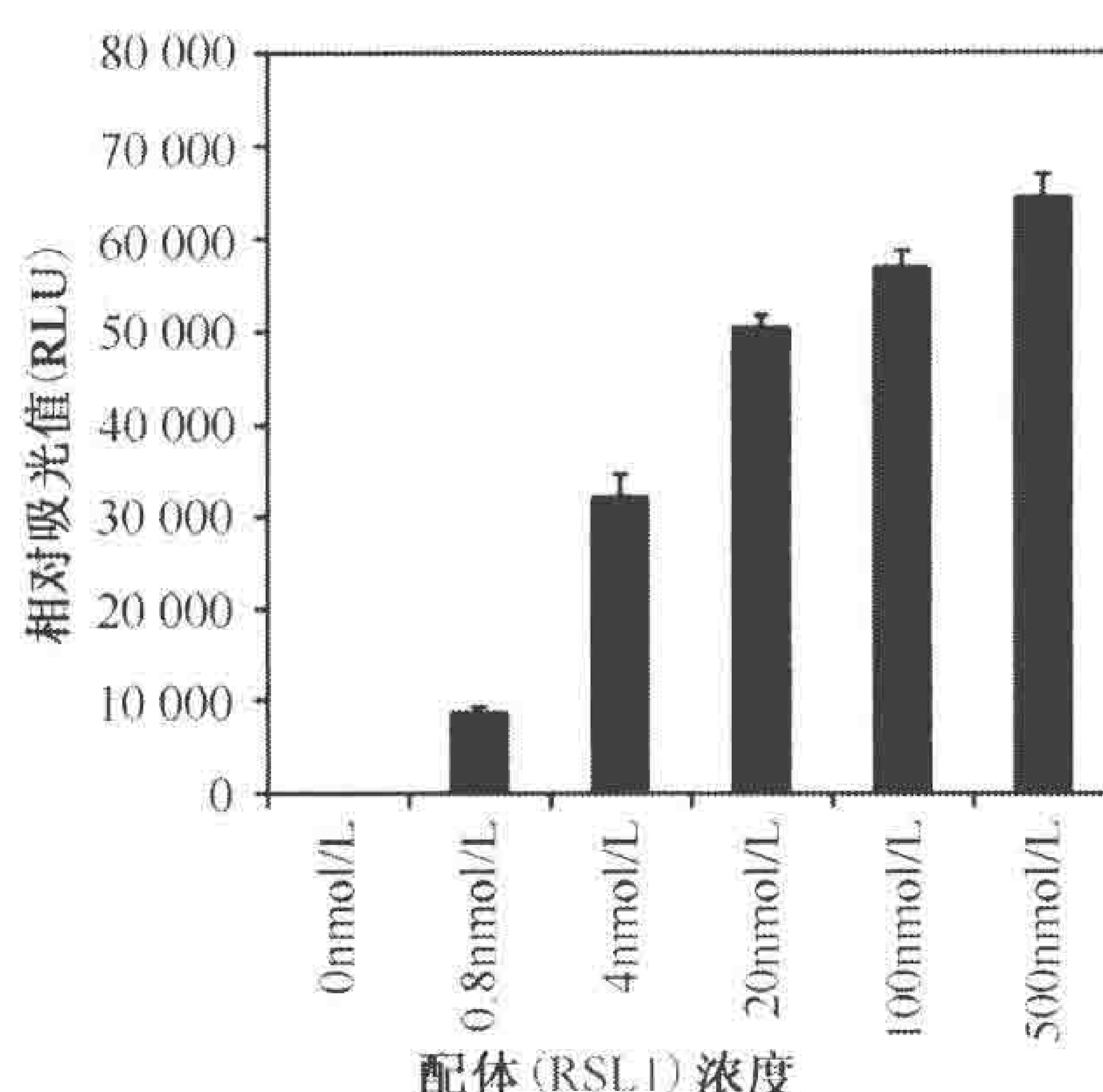



图 4. 48 孔板中的 NIH-3T3 细胞在不同浓度的配体 RSL1 作用 48h 后，萤火虫萤光素酶报告。

## 致谢


作者真诚地感谢 Dean E. Cress，Malla Padidam，Subba Reddy Palli，David W. Potter 和 Camille J. Tornetta 博士，感谢他们的建议及对本章节准备材料的编辑。


## 参考文献


Christopherson K.S., Mark M.R., Bajaj V., and Godowski P.J. 1992. Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 6314–6318.

Dhadialla T.S., Carlson G.R., and Le D.P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* **43:** 545–569.

Karzenowski D., Potter D.W., and Padidam M. 2005. Inducible control of transgene expression with ecdysone receptor: Gene switches with high sensitivity, robust expression, and reduced size. *Biotechniques* **39:** 191–200.

Kumar M.B., Fujimoto T., Potter D.W., Deng Q., and Palli S.R. 2002. A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: Implications for gene switch applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 14710–14715.

Kumar M.B., Potter D.W., Hormann R.E., Edwards A., Tice C.M., Smith H.C., Dipietro M.A., Polley M., Lawless M., Wolohan P.R., Kethidi D.R., and Palli S.R. 2004. Highly flexible ligand binding pocket of ecdysone receptor: A single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists. *J. Biol. Chem.* **279:** 27211–27218.

No D., Yao T.P., and Evans R.M. 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 3346–3351.

Palli S.R., Hormann R.E., Schlattner U., and Lezzi M. 2005. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. *Vitam. Horm.* **73:** 59–99.

Palli S.R., Kapitskaya M.Z., Kumar M.B., and Cress D.E. 2003. Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur. J. Biochem.* **270:** 1308–1315.

Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Suhr S.T., Gil E.B., Senut M.C., and Gage F.H. 1998. High level transactivation by a modified *Bombyx* ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 7999–8004.

# 第六十五章　嗜菌体 φC31 整合酶介导的位点特异性整合

R. Tyler Hillman 和 Michele P. Calos
Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305-5120

李永海　译



## 摘要

一些非病毒技术被用来进行有效的和稳定的真核基因转移，少数在细胞培养物和整个有机体方面仍旧被广泛应用。φC31 整合酶，一个位点特异性细菌嗜菌体重组酶，能够在实验和治疗的条件下催化转移基因插入染色体。这一酶识别和催化在嗜菌体和细菌基因组结合位点（分别为 *attP* 和 *attB*）间的单向重组。利用 φC31 整合酶进行基因转移需要把 *attB* 序列克隆到携带转移基因的载体。当这一修饰的质粒被转入含有整合酶表达质粒的细胞，φC31 整合酶能够催化转移基因质粒插入到目的基因组中的一个与野生型 *attP* 位点序列相似的限制性位点。它的优点包括其相对位点特异性和在一个广泛范围内的应用而且相对简便。由于其能够在真核细胞内进行且没有任何可检测的逆反应，所以这一酶催化的整合是高效的。有效地传递 φC31 整合酶和供体质粒到感兴趣的受体组织或细胞仍然是这一整合系统中最具挑战性的内容。不像利用病毒的方法对基因组进行操作，用 φC31 整合酶几乎总是需要一个额外的方法来刺激细胞对 DNA 的摄取。然而，相对简单的质粒系统意味着几乎所有已证明的可行的导入外源 DNA 进入细胞的方法都能够用 φC31 整合酶来实现。事实上，多种转染技术有时显示出适合于这方面的应用。

## 引言

操作真核基因组的能力在几种不同的，但是相关的方面同时进行发展。许多可以用

来进行稳定地转基因整合的方法在一个或多个以下 3 种广泛定义的应用中十分有用：对培养物细胞进行的操作，转基因有机体的构建和基因治疗。Cre 和 Flp 重组酶是前两种方法中所用技术的基础。利用这些酶需要在操作之前把靶序列人工插入基因组，限制了它们在重新创建转基因细胞方面的应用（Sauer and Henderson 1988，1990；O'Gorman et al. 1991）。另外，由 Cre 和 Flp 催化的整合反应的效率被其可逆反应所降低。病毒基因转移载体，尤其是那些慢病毒家族，由于对培养细胞的稳定修饰最近得到普遍应用。慢病毒载体能够高效感染非周期细胞和整合它们荷载的序列到未修饰的染色体上。然而，慢病毒整合位点比较随机而且倾向于接近活跃表达基因（Schroder et al. 2002；Mitchell et al. 2004）。对慢病毒整合的多样性和特异性难以控制。类似地，"睡美人"转座子也介导随机整合（Vigdal et al. 2002）。"睡美人"和病毒系统都对转移基因的大小有限制。

ϕC31 整合酶是丝氨酸重组酶蛋白家族（它们发展成为一个基因操作的系统）的成员之一（Groth et al. 2000；Thyagarajan et al. 2001；Groth and Calos 2004）。嗜菌体整合酶如 ϕC31 识别 30～40 个碱基的细菌染色体结合序列（*attB* 位点）和嗜菌体基因组结合序列（*attP* 位点），进一步催化两者之间的重组反应（图 1A）。嗜菌体整合的过程中专一性地切开 *attB* 和 *attP* 位点而把它们互相连接在一起，产生两个杂合的序列（*attL* 和 *attR*），它们紧邻在整合的嗜菌体基因组两侧。这一酶在稳定基因转移方面的应用被其与前面所述的方法相比对整合位点的相对特异性选择的特点所加强。ϕC31 整合酶识别一些在真核染色体 *attP* 位点内在的序列而且能够整合进去一个含 *attB* 位点的转基因质粒（图 1B）（Thyagarajan et al. 2001）。现已证实在人和鼠的细胞中存在许多这些类似的 *attP* 位点，并公布了存在的引物对来检测最易发生整合的克隆（Thyagara-

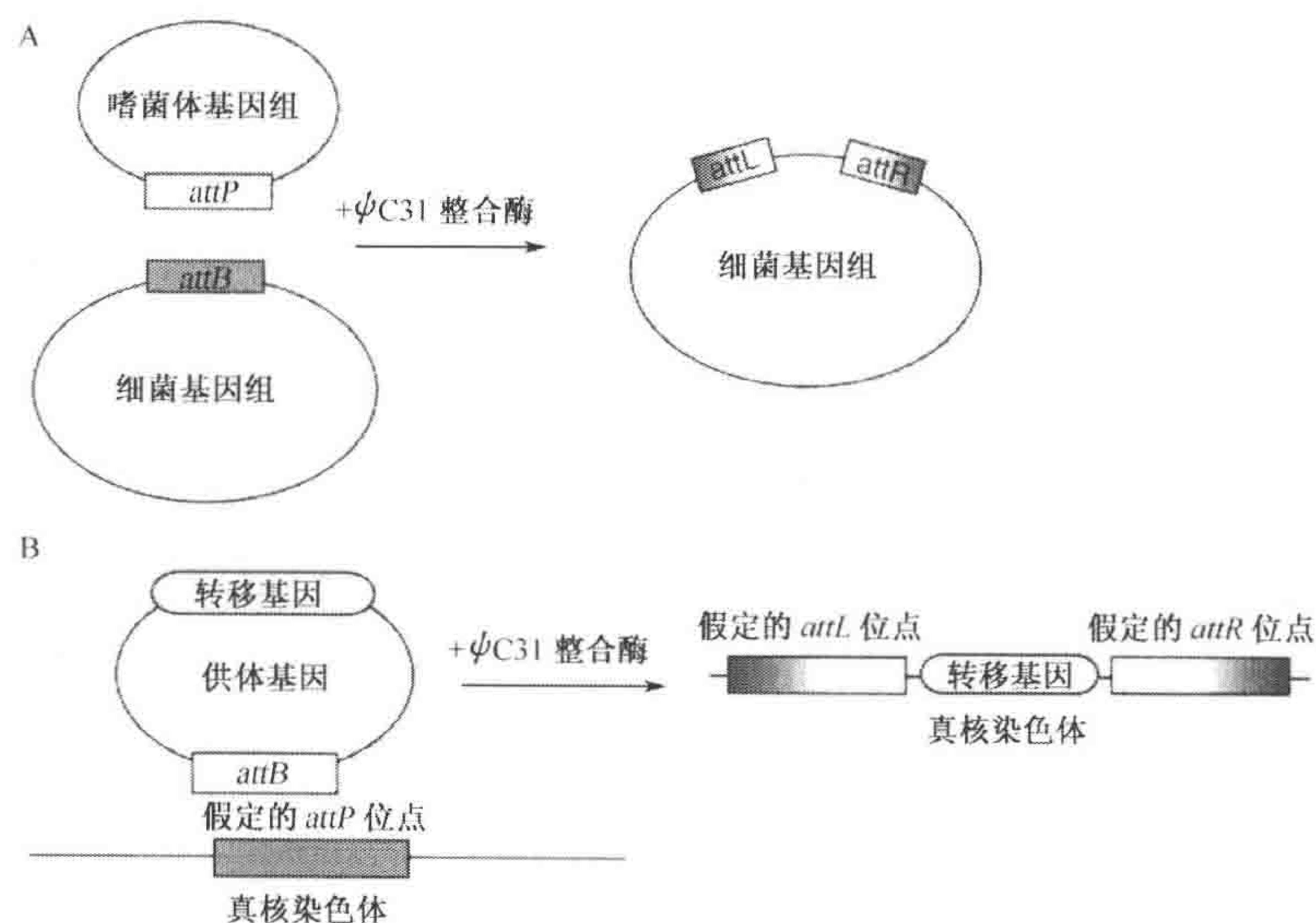



图 1. 天然和修饰的 ϕC31 整合酶反应。A. 天然的 ϕC31 整合酶通过 *attP* 和 *attB* 位点间的重组来催化宿主和嗜菌体基因组重组。B. 我们修改 ϕC31 整合酶用于真核基因组的整合。在有酶存在下，含有 *attB* 位点的供体质粒将进行有效的和位点特异性的整合。

jan et al. 2001；Olivares et al. 2002；Chalberg et al. 2006）。在每一个目前检测的真核基因组中都发现了这些类似的 *attP* 位点，但是仍然不能在基因组的范围内充分的给出可能进行整合的明确的特异性位点。最初在哺乳动物细胞中由 ϕC31 整合酶催化的反应无需另外的辅因子参与，然而相反的切除反应却需要辅因子参与（Thorpe and Smith 1998）。这一特点使整合反应变得十分有效。

一种利用 ϕC31 整合酶进行遗传操作模式包括构建含待转移基因和 *attB* 位点的质粒载体。在整合酶存在的情况下，这样一个载体将可能在一个染色体的类似 *attP* 位点上进行有效的单向整合（Thyagarajan et al. 2001；Thyagarajan and Calos 2005）。ϕC31 整合酶系统在一个类似的应用作为一个基因治疗和构建转基因有机体的工具上也获得了显著的成功。然而，这些应用不在本章的讨论范围（Olivares et al. 2002；Allen and Weeks 2005；Chalberg et al. 2005）。该酶也能催化有效的整合，删除和在提前转入的 *att* 位点上的交换（Thomason et al. 2001；Thyagarajan et al. 2001；Belteki et al. 2003；Groth et al. 2004）。

本章描述了用 ϕC31 整合酶对未修饰的哺乳动物细胞培养物进行有效的稳定转染的详细方法。特别强调了分离和确定每一个转基因克隆时药物的选择使用。质粒的转入方法随不同应用和组织类型而有很大不同，但是最基本的决定 ϕC31 整合酶系统的使用原则却是相同的。这样，这里描述的方法的细节能够被容易地推广到其他的使用情形和细胞类型中去。

ϕC31 整合酶系统能够被联合使用在几乎所有 DNA 转染方法当中。对于细胞培养物，这种方法包括亲脂试剂（FuGENE6，Roche；Lipofectamine2000，Invitrogen）、标准的毫秒脉冲电穿孔（ECM 830，BTX 分子转移系统）和 Nucleofector 技术（Amaxa）。对转化方法的选择取决于实验条件和细胞类型，但是所有的方法应该考虑是否能用 ϕC31 整合酶的使用来互换。在使用 ϕC31 整合酶系统进行稳定转染之前，一个 *attB* 序列必须加到携带感兴趣的待转移基因的质粒上。这能够用标准的克隆技术、限制性内切核酸酶及缓冲液来完成。

一个 PCR 引物板被发展来检测细胞中 ϕC31 整合酶介导的特异性整合的发生。虽然已在人类的细胞株中发现了多于 100 个 ϕC31 整合位点，但是由表 1 中引物检测到的 3 个位点显示出可能被许多细胞类型中的酶所利用的最好的位点（Chalberg et al. 2006）。这些引物对和预期的 PCR 反应产物的大小详见表 1。有一些证据显示在 19 号染色体上发现的整合位点可能是最好的位点，因此在用这些引物进行任何检测时总是首先被探测到。整合位点为部分回文结构，这使整合可以在任意方向发生。在表 1 中我们把这些整合人为地规定为正向和反向，用引物序列能够检测任一整合方向。

**表 1. 在人类细胞中检测 ϕC31 整合位点的 PCR 引物**

| 载体引物 | 名称 | 序列（5′→3′） |
|---|---|---|
| 第一轮（*attL*） | *attBF2* | ATGTAGGTCACGGTCTCGAAGC |
| 第一轮（*attR*） | *ChoSeqR* | TCCCGTGCTCACCGTGACCAC |
| 第二轮（*attL*） | *attBF3* | CGAAGCCCGCGGTGCG |
| 第二轮（*attR*） | *attBF2* | ACTACCGCCACCTCGAC |

续表

| 第一轮 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 基因组位点 | 方向 | 名称 | 序列（5′→3′） |
| Xq22.1 | F | Xq22-A1 | CTGGAGTACAGTGGCGCGCGATCT |
| | R | Xq22-932＋ | CACCCAGGCCATTAACAACTC |
| 8p22 | F | psA-R | AAGTCTTCTGGCTATACAGG |
| | R | psA-F2 | TATACCAGACCAGTAGAAAG |
| 19q13.31 | F | chr19-B1 | CCAAGCGTCATCAGAAGTCCAACGAC |
| | R | chr19-A1 | TTGTGTGATTCTGCTGCCTTACACCA |

| 第二轮 | | 产物大小/bp（用指定的载体引物） | |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 序列（5′→3′） | *attBF3* | *attBR2* |
| Xq22-A2 | CTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGC | 506 | |
| Xq2-738＋ | CCCCAATTTTTCTGTTTAAGAT | 766 | |
| psLL1 | TTGCATGGCCTCATTTCCGTC | 323 | 362 |
| psA-F | ATTTGTAGAACTATTATGGG | 183 | 222 |
| chr19-B2 | ATAGTCCCAGCGACAGTGAGCAATTC | 331 | 370 |
| chr19-A2 | GCAGGGTAGCAGATGGAACACTTAGC | 409 | 448 |

## 方案

# 用细菌噬菌体 ϕC31 整合酶进行的位点特异性整合

这一操作流程描述了用 ϕC31 整合酶在哺乳动物细胞培养物中产生可以稳定表达实验转移基因的克隆。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖和上样缓冲液
细胞：永生化哺乳动物细胞系或原代细胞
DNA 连接酶和合适的连接缓冲液
DNeasy Tissue Kit（QIAGEN）或其他用来提取基因组 DNA
电转移用的大肠杆菌 DH10B 感受态
胎牛血清
FuGENE6 转染试剂（Roche）或同等试剂
G418< !>或其他适当的选择药物
硫酸庆大霉素（GIBCO）或其他适合的在哺乳动物细胞中进行选择的药物
培养基
　高葡萄糖的 DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）
　含选择性抗生素的 LB（Luria-Bertani）琼脂板

含选择性抗生素的 LB 液体培养基

Opti-MEM I 培养基（Invitrogen）

补充的 DMEM 培养基：高葡萄糖且添加了 9% FBS 和 1%青霉素或链霉素<!>

质粒

整合酶表达质粒，pCMVInt（Groth et al. 2000）和适合的控制质粒 pCMVmInt（Olivares et al.，2002）

pCMVmInt 与 pCMVInt 的区别主要是在催化位点丝氨酸的突变致使其编码的产物 ϕC31 整合酶失活

含有一个物种和细胞类型感兴趣的待转移基因的适当的表达盒的质粒。

如果要用药物进行选择，应包括一个适当的哺乳动物抗性基因。

质粒包括最小（34bp）或者全长（约 300bp）*attB* 序列（Groth et al. 2000）

pEGFP-C1 报道质粒

Qiafilter Plasmid Maxi Kit（QIAGEN）或同等试剂盒

QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）或同等试剂盒

PCR 寡核苷酸，如表 1 所示

磷酸盐缓冲液（PBS）

限制性内切核酸酶和适当的缓冲液

胰岛素（0.05%）<!>/EDTA（1mmol/L）（Invitrogen 或同等试剂）

### 仪器

离心机

电穿孔仪（Bio-Rad）或其他细菌转化方法

流式细胞仪

血球计

孵育器，预设为 37℃

小离心管

组织培养板（6 孔和 100mm）

管（12×75 Falcon）

## 方法

### 转化

1. 构建含有 *attB* 位点和感兴趣的待转移基因的供体质粒，克隆 ϕC31 整合酶 *attB* 序列到表达载体。注意整合效率与 *attB* 的位置和方向无显著相关。这一质粒构建步骤要求合适的酶和试剂，如含选择性抗生素的 LB 琼脂板和一个 QIAquick GEL Extraction Kit。转化供体质粒到电转化感受态细胞 DH10B 大肠杆菌接种到适量的 LB 培养基。用 Qiafilter Plasmid Maxi Kit 可能得到足够纯度的 DNA 来进行后续的实验。
2. 转染前 24h，用 0.05% 胰酶/1mmol/L EDTA 收获黏附哺乳动物细胞。用桌面离心机 1200r/min 离心 10min，用适当体积的 PBS 重悬沉淀，用血球计数器进行计数。

在6孔板上铺4个孔，种子浓度为30%，用适合此细胞类型的培养条件37℃孵育过夜。

3. 各取100μl Opti-MEM I加到4个小离心管中，每一个管中加3μl室温的FuGENE6，温和混匀，室温孵育5min。
4. 用以下方法在各管中加入DNA：

   管1：无DNA

   管2：1μg pEGFP-C1报道质粒

   管3：900ng pCMVInt和100ng转基因质粒

   管4：900ng pCMVmInt和100ng转基因质粒

   温和混匀室温孵育25min。
5. 吸去每孔的培养基，每孔补加2ml DMEM培养基。然后每孔分别逐滴加入100μl Opti-MEM I中的脂质体DNA复合体，37℃孵育过夜。
6. 转染24h后，用流式细胞仪检测转染效率，操作如下：
   a. 收获细胞从无DNA和1μg pEGFP-C1孔，用1ml 0.05%胰酶/1mmol/L的EDTA。
   b. 用桌面离心机1200r/min，10min离心收集细胞。
   c. 重悬沉淀到200μl PBS，转移到12×75 Falcon管作流式细胞分析GFP的表达情况。

   一般情况下，转染效率超过15%已经足够了。为了建立稳定转染，可进行以下可选择的操作。
7. 胰蛋白酶作用和重新铺两个孔的细胞到3个100mm的培养皿中，并补加DMEM培养基，每一孔用1/3最初孔的体积接种100mm培养皿，另外两个分别用1/10和1/30。

   铺板的梯度减少了转染效率对随着一段时间的选择辨别直接的耐药克隆的能力的影响。
8. 铺板后24h，吸掉培养基，补加含1.25mg/ml G418（*m*/*V*）的DMEM，或其他合适的药物浓度。
9. 每4天替换1次选择培养基，注意不要丢掉初生的克隆。

   随后的14d药物选择中，应该能够容易地确认独特的克隆。

## 可供选择的方法

### 稳定转染群

紧接前面的步骤6，用以下方法操作：

1. 胰酶消化从两个孔得到的流式细胞检测后的细胞。用桌面离心机1200r/min离心10min收集细胞，重悬细胞沉淀到补充的DMEN培养基。
2. 分别铺每孔的全部培养物到100mm细胞培养板。使细胞像通常一样生长到一定的密度和传代。
3. 传几代以后，用适当的方法检测转移基因的表达。最初用ϕC31整合酶和转基因*attB*质粒转染的细胞转移基因的表达应该比对照高几倍（Thyagarajan and Calos 2005)。

## 补充方案

### 整合位点的 PCR 检测

1. 为了进行综合的 PCR 面板检测，用 DNeasy Tissue Kit 或与操作手册相符的同等试剂从转染的细胞或无性系准备基因组 DNA。
2. 用表 1 中的引物和巢式 PCR 的方法进行综合检测。主要过程是，首先第一轮依次用 *attBF2* 和 *ChoSeqR* 引物和其他各个位点特异性引物从基因组 DNA 中模板中扩增出 loci，第一轮扩增的区域随后用作第二次 PCR 的模板，其引物为 *attBF3* 或 *attBF2* 和适当的表 1 中的第二轮引物。
3. 用琼脂糖电泳检测第二轮的 PCR 产物。

将出现的条带与表 1 中的条带相比较将确定转基因质粒整合的位置。

## 致谢

R. T. H. 是霍华德·休斯医学中心医科学生科研训练人员。这一研究工作得到 NI-HDK58187 和 HL68112 对 M. P. C. 的资助。

## 参 考 文 献

Allen B.G. and Weeks D.L. 2005. Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using ϕC31 integrase. *Nat. Methods* **2:** 975–979.

Belteki G., Gertsenstein M., Ow D.W., and Nagy A. 2003. Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing ϕC31 integrase. *Nat. Biotechnol.* **21:** 321–324.

Chalberg T.W., Genise H.L., Vollrath D., and Calos M.P. 2005. ϕC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46:** 2140–2146.

Chalberg T.W., Portlock J.L., Olivares E.C., Thyagarajan B., Kirby P.J., Hillman R.T., Hoelters J., and Calos M.P. 2006. Integration specificity of phage ϕC31 integrase in the human genome. *J. Mol. Biol.* **357:** 28–48.

Groth A.C. and Calos M.P. 2004. Phage integrases: Biology and applications. *J. Mol. Biol.* **335:** 667–678.

Groth A.C., Fish M., Nusse R., and Calos M.P. 2004. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕC31. *Genetics* **166:** 1775–1782.

Groth A.C., Olivares E.C., Thyagarajan B., and Calos M.P. 2000. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **7:** 5995–6000.

Mitchell R.S., Beitzel B.F., Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C.C., Ecker J.R., and Bushman F.D. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* **2:** E234.

O'Gorman S., Fox D.T., and Wahl G.M. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251:** 1351–1355.

Olivares E.C., Hollis R.P., Chalberg T.W., Meuse L., Kay M.A., and Calos M.P. 2002. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat. Biotechnol.* **20:** 1124–1128.

Sauer B. and Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85:** 5166–5170.

——. 1990. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol.* **2:** 441–449.

Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R., and Bushman F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110:** 521–529.

Thomason L.C., Calendar R., and Ow D.W. 2001. Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage ϕC31 site-specific recombination system. *Mol. Genet. Genomics* **265:** 1031–1038.

Thorpe H.M. and Smith M.C. 1998. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 5505–5510.

Thyagarajan B. and Calos M.P. 2005. Site-specific integration for high-level protein production in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* **308:** 99–106.

Thyagarajan B., Olivares E.C., Hollis R.P., Ginsburg D.S., and Calos M.P. 2001. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕC31 integrase. *Mol. Cell. Biol.* **21:** 3926–3934.

Vigdal T.J., Kaufman C.D., Izsvak Z., Voytas D.F., and Ivics Z. 2002. Common physical properties of DNA affecting target site selection of *Sleeping Beauty* and other Tc1/*mariner* transposable elements. *J. Mol. Biol.* **323:** 441–452.

# 第六十六章　利用模块装配方法构建锌指核酸酶以位点特异的方式操作基因组

Matthew Porteus

Department of Pediatrics and Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390

金海霞　译



## 摘要

同源重组是基因组操作中最精确的一种方法。作为一个工具，同源重组已经广泛地用于细菌、酵母、鼠胚胎干细胞（ES），以及其他一些特殊细胞系，但在其他系统如哺乳动物体细胞遗传学上还没有得到应用。最近的研究工作表明，在哺乳动物体细胞中，双链 DNA 发生基因特异的断裂，能够引起上千倍的同源重组。目前，利用锌指核酸酶（ZFN），能够在哺乳动物基因组中形成这种双链断裂。ZFN 是一种人工蛋白质，由一个锌指 DNA 结合结构域与一个非特异性的核酸酶结构域融合而成。本章描述如何鉴定 ZFN 切割的潜在靶向，如何使 ZFN 切割该靶向位点，以及测定这些新设计的 ZFN 在培养的哺乳动物细胞系统中是否有活性。同时，本章也描述了如何聚集 ZFN 来识别类似 5′-GNNGNNGNN-3′的靶向序列。在识别其他形式的靶向序列时，是否需要 ZFN 有效可靠的聚集，这还需要进一步的研究来确定。在以后的几年，在形成单指模上，可能会有所改善。联合筛选和装配的高通量方法可能得到改善，从而增加靶向位点的数目，优化 ZFN 的总体结构，并增加 ZFN 潜在的实验和治疗用途。

## 引言

在这一章中，基因靶向定义为通过同源重组将基因信息从导入的DNA片段转移到基因组中。它是基因组操作最精确的方法，能够同时将大（如导入新DNA的数千个碱基对）小（如单个核酸的改变）变化导入一个细胞的基因组中。在研究细菌、酵母、鼠ES细胞（Capecchi 1989）以及其他一些特殊细胞系如鸡DT40细胞系（Buerstedde and Takeda 1991）时，基因靶向已经成为研究工作者一个强有力的实验室工具。此外，基因靶向的精确性使它成为基因治疗的一个理想途径。但是，基因靶向的低自发重组效率限制了它在脊椎动物细胞中的实验室研究以及它的治疗用途。例如，在HEK-293细胞中，基因靶向的自发重组效率大约为$10^{-6}$（每1万个转染细胞中，1个细胞发生同源重组）（Porteus and Baltimore 2003）。

在同源重组发展成为一个工具的过程中，一个重要的发现是：DNA双链在靶向基因上发生断裂能够使该位点的靶向作用增加数千倍（Jasin 1996）。这些实验通常按以下方式进行：在报道基因中引入I-*Sce*I（Sce）靶向内切核酸酶（DNA内切核酸酶，有一个18bp的识别位点）的识别位点，接着将修饰后的报道基因作为一个转基因导入目的细胞。在引入I-*Sce*I内切核酸酶和一个供体质粒作为同源重组的模板后，通过对突变报道基因的校正，计算基因靶向的效率。该方法一个明显的限制条件是没有一个人类基因含有I-*Sce*I内切核酸酶的天然识别位点。

第二个重要的发现是ZFN即先前所说的嵌合体核酸酶，它可以促进人类体细胞中的基因靶向（Porteus and Baltimore 2003）。ZFN是一种人工蛋白质，由一个锌指DNA结合结构域与一个非特异性的核酸酶结构域融合而成（Kim et al. 1996）。到目前为止，ZFN中已经检测到的唯一一个核酸酶结构域是从IIS型*Fok*I限制性内切核酸酶衍生而来。利用ZFN模型，首次验证了ZFN促进基因靶向的能力，该ZFN的锌指结构域是从含有已知结合位点的锌指蛋白衍生而来的。此后，新合成的ZFN可以识别天然基因的新靶向序列（Alwin et al. 2005；Porteus 2006）。利用转基因绿色荧光蛋白（GFP）报告分析方法，发现这些核酸酶能够使靶向作用增加数千倍。更显著的是，Uronv等（2005）的实验表明，ZFN能够在高达20%的细胞中促进内源IL2RG位点的靶向作用。这些研究工作者在设计IL2RG ZFN时首先根据现有的特定结构信息装配锌指结构域，接着利用关于锌指-DNA结合的高专业知识进一步优化锌指。但是，这些文件和专业知识不是每一个研究工作者都具有的。

### 通过模块的装配构建新的锌指蛋白

选择性“模块-装配”方法是利用先前所描述的单锌指来装配一个锌指蛋白。该方法基于两个重要的特点：①与DNA结合的锌指模块的性质；②关于单锌指以及同源DNA结合位点已发表的数据。锌指结构域的晶体结构揭示了锌指结合模块的性质（Pavletich and Pabo 1991；Pabo et al. 2001）。单锌指由30个氨基酸组成，氨基酸以ββα结构进行排列，并通过螯合一个锌离子得以稳定。锌指的α螺旋处于大沟。在α螺旋中，锌指通过α螺旋-1～6的氨基酸残基介导DNA的结合。一个锌指蛋白由一系列

单锌指组成。因此，三指蛋白指的是含有 3 个单锌指结构域的蛋白质。锌指结合的模块性质有两方面：①每个单锌指与一个非重叠三联体结合，而且不依赖于它相邻的锌指；②每个锌指都用单个氨基酸与三联体的每个碱基相互接触。从这两个模块性质得到两个推测：①改变一个单锌指的氨基酸接触残基，可以得到一个结合于不同 3bp 序列的新锌指；②改变不同单锌指的排列，可以得到具有新特异性靶位点的新锌指蛋白。例如，对于一个三指蛋白而言，这就表示我们将获得具有新 9bp 结合位点的蛋白质。关于锌指结合模块模型的试验、优点和限制在其他地方有详细的描述（Wolfe et al. 2000；Pabo et al. 2001）。许多单锌指已经发表，它们都结合于唯一的三联体结合位点，包括 5′-GNN-3′结构（Segal et al. 1999；Dreier et al. 2000；Liu et al. 2002），5′-ANN-3′和 5′-CNN-3′结构（Dreier et al. 2001，2005）。

利用结合模块的性质和已发表的数据，已经获得许多人工转录因子（Segal et al. 2003）。几乎全部都被设计成识别富含 5′-GNN-3′靶位点三联体的靶序列。原因可能是已发表的识别 GNN 三联体的单锌指的质量比结合于非 GNN 三联体的单锌指的质量高。其次，结合于 GNN 三联体的锌指在结合上更具有模块性，对相邻结构域结合情况的依赖性较少。锌指 DNA 结合的详细研究已经表明结合并不完全是模块性的，一个锌指的结合也依赖于相邻的锌指。因此，锌指的结合存在“背景”依赖性。对于设计新锌指蛋白的模块-装配方法，一个重要的失败原因是忽视了背景依赖性。

## ZFN 靶点的鉴定

首先定义几个术语。在切割 DNA 时，*Fok*I 核酸酶结构域必须形成二聚体。当两个 ZFN 以正确的倾向性结合于各自的同源结合位点时，二聚体形成。每个 ZFN 结合于各自的 9bp 识别位点。由于单个位点不足以造成 DNA 的切割，因此将单个 ZFN 结合位点称作“ZFN 半位点”。将定位于相反方向（核酸酶二聚体形成所必需的）的一对 ZFN 半位点称作“ZFN 全位点”。两个 ZFN 半位点之间的间隔序列应为 5bp 或 6bp。来自哺乳动物和其他体系的证据表明，更长的间隔序列，其有效性降低。在哺乳动物细胞中，对于短序列，以及不同长度的间隔序列在不同体系中的比较，还没有进行研究。如果两个半位点之间的间隔序列为 6bp，称作“ZFN 全位点（6）”，如果间隔序列为 5bp，就称作“ZFN 全位点（5）”。

第一步是在感兴趣的靶基因处，设计一对 ZFN 来识别一个 ZFN 全位点（间隔序列为 5bp 或 6bp）。由于已发表的识别 5′-GNN-3′的锌指结构域在模块-装配中工作效率最高，我们将研究限制在 5′-GNNGNNGNN-3′结构的半位点靶序列上。Alwin 等（2005）获得一个识别 5′-AGGGATAAC-3′靶位点的活性 ZFN。将来的工作将测定模块-装配方法获得识别不含所有 5′-GNN-3′三联体的靶序列的 ZFN 的频率有多少（Alwin et al. 2005）。我们利用 DNAsis 程序找到了 5′-NNCNNCNNCnnnnnnGNNGNNGNN-3′［ZFN 全位点（6）］或者 5′-NNCNNCNNCnnnnnGNNGNNGNN-3′［ZFN 全位点（5）］结构的序列。在 GFP 编码区，存在 3 个 ZFN 全位点（6）和 2 个 ZFN 全位点（5）。可以利用其他搜索程序鉴定可能的 ZFN 全位点。Porteus 装配了靶向于数量最多的 5′ZFN 全位点（6）的 ZFN（Porteus 2006）。

在鉴定了一个潜在的 ZFN 全位点后，第二步是设计识别每个 ZFN 半位点的锌指蛋

白。关于识别 GNN 三联体的锌指结构域，已经发表了 2 个重要的数据库（Segal et al. 1999；Liu et al. 2002）。我们已经利用了来自 Liu 等（2002）的数据库，但还没有正式将它与 Segal 等（1999）的数据库进行比较以确定哪个更好。Porteus（2006）和 Alwin 等（2005）都致力于获得识别 GFP 基因中 2 个 ZFN 半位点的 ZFN。Porteus 利用 Liu 等（2002）的数据库成功地获得了识别 2 个半位点的活性 ZFN，而 Alwin 等（2005）利用 Segal 等（1999）的数据库只成功地获得了识别其中一个半位点的 ZFN。进一步的实验将确定哪个数据库能够更好地利用。利用 Liu 等（2002）的数据库，我们已经成功地靶向于 5′-GNNGNNGNN-3′结构的 ZFN 半位点，虽然有效性有所变化，但我们尝试了 10 次，10 次全部获得成功，这是用下面所描述的 GFP 基因 靶向报告系统进行测定的。

靶向于 GFP 基因的一个 ZFN 全位点（6）序列是：5′-ACCATCTTCttcaag-GACGACGGC-3′。因此，设计的一个 ZFN 必须识别 ZFN 半位点（1）5′-GAAGATG-GT-3′，另一个识别 ZFN 半位点（2）5′-GACGACGGC-3′。锌指以“反平行”的方式结合于 DNA，如指 1（最 N 端的指）结合于三联体的最 3′端。最近两篇综述给出了这种反平行结合的图示（Durai et al. 2005；Porteus and Carroll 2005）。因此，GFP1-ZFN 的指 1 必须结合于 5′-GGT-3′，指 2 结合于 5′-GAT-3′，而指 3 结合于 5′-GAA-3′。接着，根据 Liu 等（2002）的图 1 推论得到识别 α 螺旋的氨基酸组成。对于 GFP1-ZFN，指 1α 螺旋的结果是 QSSHLTR，指 2 为 TSGNLVR，而指 3 为 QSGNLAR（氨基酸的标准单字母缩写）。Porteus（2006）的表 1 描述了 α 螺旋的氨基酸组成，带有 5 个锌指包括 GFP2-ZFN 预期的 DNA 靶向结合位点。Liu 等（2002）给出的排列顺序与他们在

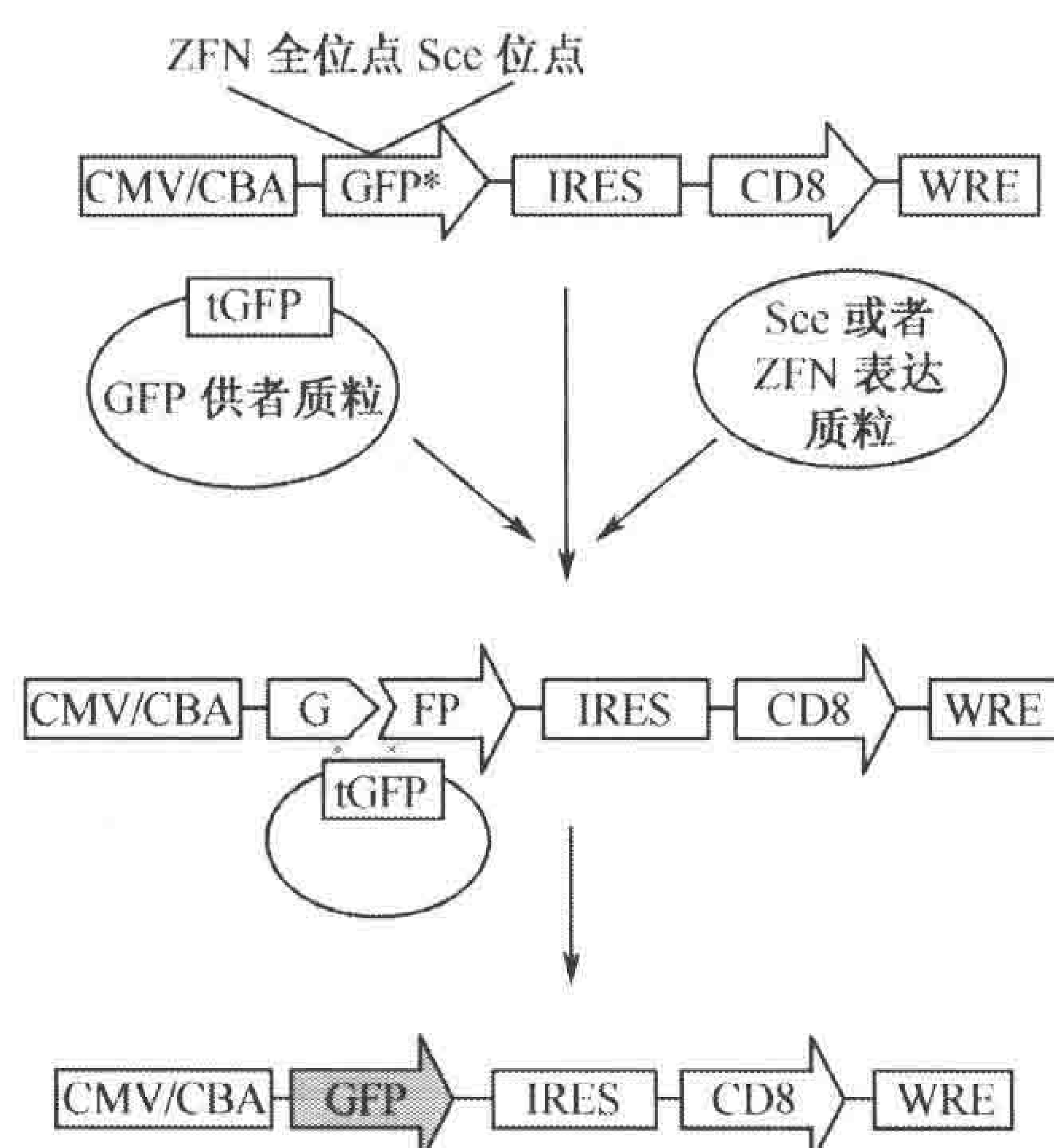



图 1. GFP 基因靶向报道系统的图示。为了测定基因靶向，建立了一个只有单拷贝 GFP 报道基因的细胞系。该 GFP 报道基因含有 I-*SceI* 内切核酸酶的识别位点，GFP-ZFN，以及从 Zif268 半位点获得的全靶向位点和新装配的 ZFN 的靶位点。接着利用标准技术将核酸酶表达质粒转染入报道细胞系，同时转染一个修复供者质粒。转染后 3d，用流式细胞仪分析细胞中 GFP 阳性的细胞数。（IRES）内部核糖体进入位点；（WRE）旱獭转录后调节元件；（CMV/CBA）巨细胞病毒-鸡 β-肌动蛋白杂合增强启动子。

设计 ZFN 中的顺序相反。例如，GFP1-ZFN 的指 1 被设计成识别三联体的5′GGT-3′，即总结合位点中三联体的最 3′端，采用的是 Liu 等（2002）“指 3”的氨基酸，因为在他们的表中，这才是三联体的最 3′端。

**表 1. 装配新三指蛋白的寡聚核苷酸**

指 1 共用引物（引物 A）：5′-CAGTGCGGCCGCTCTAGAAC-3′

指 2 共用引物（引物 B）：5′-CATATCCGCATCCATACC-3′

指 3 共用引物（引物 C）：5′-CACATCCGCACCCACACA-3′

指1 特异引物：5′ GTA TGG ATG CGG ATA TG－1～6 氨基酸的反义密码子 AGA AAA GCG GCG ATC GC 3′

如 GFP1-ZFN 指 1（靶三联体 GGT)：5′ GTA TGG ATG CGG ATA TG **CCT CGT GAG GTG AGA AGA CTG** AGA AAA GCG GCG ATC GC 3′

指2 特异引物：5′ GTG TGG GTG CGG ATG TG－1～6 氨基酸的反义密码子 ACT GAA GTT ACG CAT GC 3′

如 GFP1-ZFN 指 2（靶三联体 GGT)：5′ GTG TGG GTG CGG ATG TG **GCG GAC AAG GTT GCC ACT AGT** ACT GAA GTT ACG CAT GC 3′

指 3 特异引物：5′ TTG ACT AGT TG GTC CTT CTG TCT TAA ATG GAT TTT GGT ATG－1～6 氨基酸的反义密码子 GGC AAA CTT CCT CCC3′

如 GFP1-ZFN 指 3（靶三联体 GGT)：5′ TTG ACT AGT TG GTC CTT CTG TCT TAA ATG GAT TTT GGT ATG **GCG GGC AAG GTT ACC CGA CTG** GGC AAA CTT CCT CCC 3′

选取密码子使寡聚核苷酸中没有 *Bam*HI（GGATCC）或者 *Spe*I（ACTAGT）位点。

该表列出了 PCR 装配方法（见正文和图 2）中所使用的寡聚核苷酸。指特异寡聚核苷酸在定位上是反义的。为了获得这些寡聚核苷酸，首先必须利用合适的数据库推算出识别螺旋的正确氨基酸。接着，将它们反翻译成每个氨基酸的密码子，同时避免出现哺乳动物细胞中很少使用的密码子。最后，获得 21 核苷酸序列的反互补序列，并取代“－1～6 氨基酸密码子的反义”位置。

## 利用 PCR 装配一个新的三指蛋白

采用重叠 PCR 方法装配新的锌指蛋白［见图 2 和其他研究者以前所用的（Segal et al. 2003)］。利用一个 5′端的共用引物和一个 3′端的指 特异引物，扩增每个指，并且互不依赖。利用 Zif 268 主链作为每个 PCR 的模板，因为主链的异质性足以保证在最后的阶段以正确的顺序装配三指。在一些人工 ZFN 结构中，如 QQR-ZFN，每个指的识别螺旋周围的核苷酸序列是一致的，这就导致在下一步骤中通过重叠 PCR 以正确的方向装配指变得十分困难。将每个指片段进行扩增，使它与相邻的指有 15bp 的重叠。接着利用重叠 PCR 方法装配每个指（图 2，见彩版）。用 *Bam*HI 和 *Spe*I 对 PCR 产物进行酶切并克隆入已经用 *Bam*HI/*Spe*I 酶切过的 pBluescript。接着，对三 指盒进行测序，保证 PCR 过程的正确。起初，我们采用一个高保真性的聚合酶，但随后发现标准的 Taq 已经足够精确，并不会产生预期之外的点突变。表 1 给出了这个过程中使用的寡聚核苷酸。

## 测试新的三指 ZFN

测试新设计的 ZFN 的活性的方法有好几种。通过体外转录/翻译或者从其他表达系统中获得蛋白质，并在体外测试其切割 DNA 模板的活性。最初在设计 ZFN 时，Chandrasegaran 及其同事利用细菌表达并纯化的蛋白质通过体外切割的方式评估蛋白质

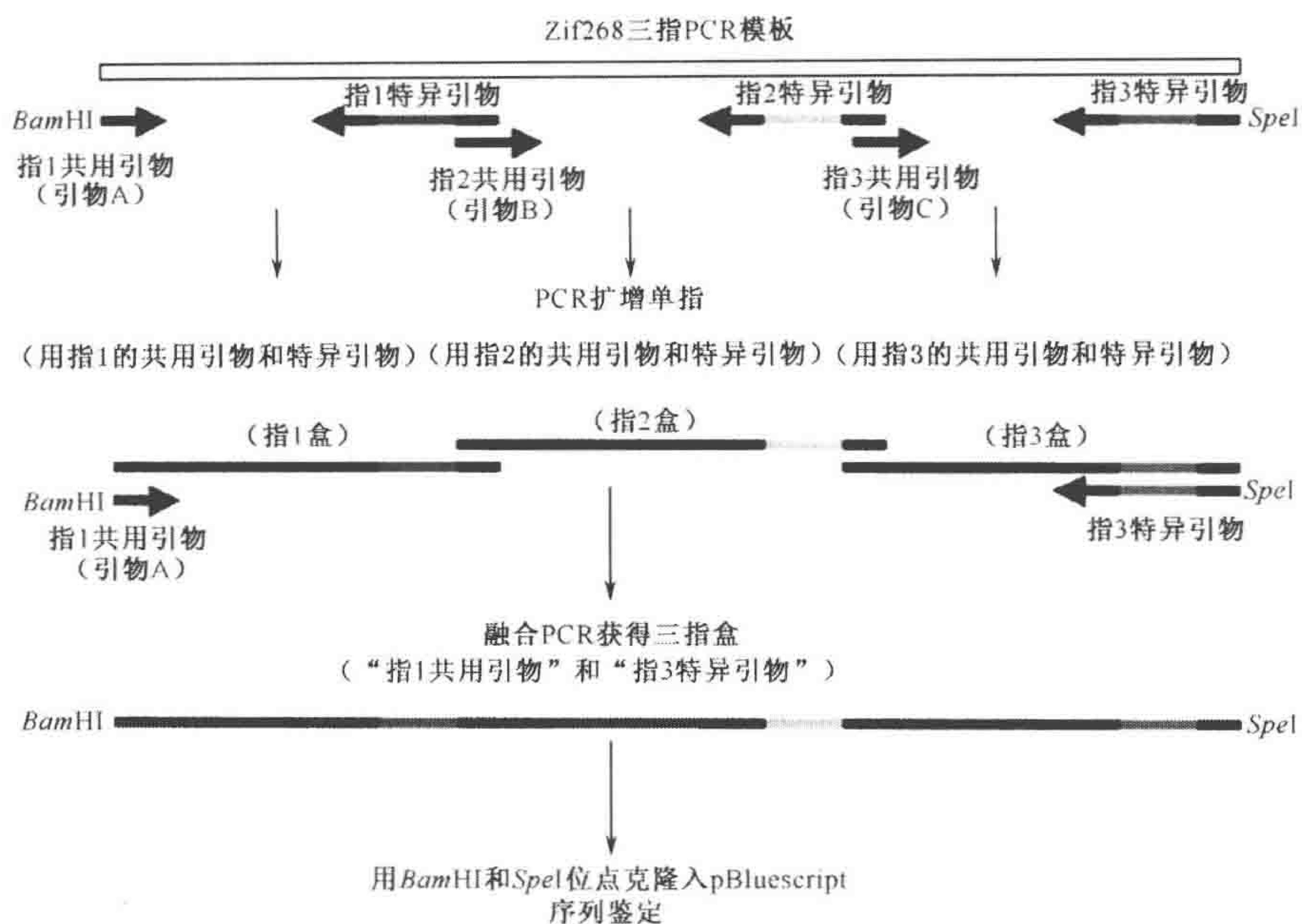



图 2．装配新锌指蛋白的图示。操作过程的实验细节见正文。颜色代表锌指 α 螺旋中介导每个指的特异 DNA 结合的氨基酸。

（Kim et al. 1996；Smith et al. 1999，2000）。Alwin 等（2005）描述了一个基于细胞的转录分析方法来测试 ZFN 中结合其邻近结合位点的新锌指成分。在我们的实验室中，我们采用了基于 GFP 的报道系统。其他地方已经对该系统进行了描述，见图 1（Porteus and Baltimore 2003；Porteus and Carroll 2005）。

## 方案 1

# 利用模块装配方法构建 ZFN

该方案首先描述了如何利用 PCR 装配一个新的三指蛋白，接着描述了如何构建一个新的 ZFN。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖凝胶（2.5%）

牛小肠碱性磷酸酯酶

dNTP（每种 10mmol/L）

转化用大肠杆菌

$MgCl_2$（50mmol/L）<!>
质粒：pBluescript（pBS-ZF）和 pcDNA6（Invitrogen）
PCR 片段纯化试剂盒
10×聚合酶缓冲液
限制性内切核酸酶：*Apa*I、*Bam*HI 和 *Spe*I
T7 引物
*Taq* 聚合酶
Zif-ZFN DNA 模板

### 仪器

37℃加热块或者水浴
按预期的扩增程序工作的循环变温加热器

## 方法

### 扩增各个单指的 PCR 步骤

1. 将以下试剂混合：

| | |
|---|---|
| Zif-ZFN DNA 模板 | 100ng |
| 10×聚合酶缓冲液 | 5μl |
| $MgCl_2$（50mmol/L） | 2μl |
| dNTP（每种 10mmol/L） | 1μl |
| 指 1（或 2、3）的特异引物 | 30pmol |
| 指 1（或 2、3）的共用引物 | 30pmol |
| *Taq* 聚合酶 | 2U |

加水至终体积 50μl

2. 用下面的参数进行扩增：

| 循环数 | 变性 | 复性 | 延长 |
|---|---|---|---|
| 第 1 个循环 | 94℃，5min | | |
| 15 个循环 | 94℃，30s | 50℃，45s | 72℃，60s |
| 最后 1 个循环 | | | 72℃，5min |

维持在 4℃。

3. 用 2.5% 琼脂糖凝胶纯化各个单指片段，最后用 30μl 缓冲液溶解。
指 1 片段的大小＝161bp
指 2 片段的大小＝100bp
指 3 片段的大小＝124bp

### PCR 装配三指蛋白

4. 将以下试剂混合：

| | |
|---|---|
| 指 1 片段 | 10μl |
| 指 2 片段 | 10μl |
| 指 3 片段 | 10μl |
| 10×聚合酶缓冲液 | 5μl |
| $MgCl_2$（50mmol/L） | 2μl |
| dNTP（每种 10mmol/L） | 1μl |
| 指 1 的共用引物 | 30pmol |
| 指 3 的特异引物 | 30pmol |
| *Taq* 聚合酶 | 2U |

加水至终体积 50μl

循环参数：见上述扩增各个单指的 PCR 步骤。

5. 用 PCR 片段纯化试剂盒纯化 PCR 产物。
6. 用 *Bam*HI 和 *Spe*I 对 PCR 产物进行酶切。
7. 用 2.5% 琼脂糖凝胶纯化酶切片段。片段的预期大小约为 312bp。
8. 将酶切/纯化的 PCR 片段克隆入经 *Bam*HI/*Spe*I 酶切的 pBluescript（Pbs-ZF）。
9. 测序验证新三指蛋白。

### 从新三指蛋白中获得一个 ZFN

10. 用 *Bam*HI/*Apa*I 酶切 pcDNA6（37℃，2h 后，室温 2h）。加入牛小肠碱性磷酸酯酶，凝胶纯化分离 5.1kb 的片段，得到的是载体片段。
11. 用 *Spe*I/*Apa*I 对 GFP1-ZFN 进行酶切（37℃ 2h 后，室温 2h），凝胶纯化分离约 591bp 的片段，得到的是 *Fok*I 核酸酶结构域（Fn）片段。
12. 用 *Bam*HI/*Spe*I 对 pBS-ZF 克隆进行酶切，凝胶纯化分离约 312bp 的片段，得到的是三条蛋白片段。
13. 按标准程序，以载体：Fn 片段：ZF 片段 1：4：4 的摩尔比连接这些片段。
14. 按标准程序，转化入 *E. coli*。
15. *Bam*HI/*Apa*I 酶切鉴定阳性克隆。

    正确克隆应有一条 5.1kb 的条带和一条 909bp 左右的条带。
16. 用 T7 引物进行测序，验证锌指的完整性以及锌指蛋白和核酸酶结构域之间的接头在框架结构内。

    该克隆方法得到的 ZFN，锌指末端组氨酸和核酸结构域第一个残基之间有 5 个氨基酸。在已发表的文献中，将这称作 L0 ZFN，但在将来，可能将它称作 L5 ZFN。

## 方案 2

## 利用 GFP 报道系统测定新三指 ZFN

该方案描述了如何利用基于细胞的 GFP 报道系统测试 ZFN。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

转化用大肠杆菌

FACS 缓冲液

　磷酸盐缓冲液（PBS）

　2% 小牛血清

　1mmol/L EDTA

　0.1% 叠氮化钠<!>

G418<!>

HEK-293 细胞

MACS 缓冲液

　PBS

　2%小牛血清

　1mmol/L EDTA

培养基

　全 DMEM：DMEM/10%牛血清（Hyclone）/2mmol/L L-谷氨酰胺

　无血清 DMEM

质粒

　GFP 表达质粒

　GFP 修复质粒（RS2700 质粒）

　I-*Sce*I 表达质粒

　亲本报道质粒（pPC17）

　Zif-ZFN 表达质粒

限制性内切核酸酶：*Bam*HI、*Eco*RI、*Hin*dIII、*Spe*I 及 *Xho*I

靶位点寡聚核苷酸（见步骤 2）

### 仪器

电转化仪（BTX ECM399）

流式细胞仪

磁珠分选系统（Miltenyi，Auburn，California）

组织培养板（10cm 和 24 孔）

## 方法

### 构建 GFP 报道质粒

1. 用 *Xho*I 和 *Hind*III 对亲本报道质粒（pPC17）进行酶切，通过凝胶纯化分离得到约 9kb 大小的质粒。
2. 合成靶位点寡聚核苷酸，其中一个半位点是 Zif-ZFN（一个活性已知的 ZFN）的结合位点，另一个半位点是新的靶位点。设计一对寡聚核苷酸，使其复性后，能够产生 *Xho*I 和 *Hind*III 的互补末端。在 ZFN 全位点的 5′端引入 *Eco*RI 位点，从而为鉴定插入寡聚核苷酸的克隆提供一个新的限制酶酶切位点。例如，为了测定具有 5′-GAGGTTGCT-3′靶位点的 HGBZF1-ZFN，我们合成了以下序列的寡聚核苷酸：

   A：5′-AGCT GAATTC CGCCCACGC ggatcc GAGGTTGCT-3′

   B：5′-TCGA AGCAACCTC ggatcc GCGTGGGCG GAATTC-3′
3. 按标准程序，将 A、B 寡聚核苷酸复性，并连入纯化的报道质粒载体中，载体：退火寡聚核苷酸的摩尔比为 1：100。
4. 按标准程序，将连接产物转化入大肠杆菌中。
5. 通过 *Eco*RI 酶切鉴定克隆。

   连入寡聚核苷酸的克隆酶切后产生 4400bp、2100bp、1700bp 的片段，在 400bp 处有一个双联体。
6. 用 A220A 引物（5′-ACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGG-3′）对酶切后有正确片段的克隆进行测序，验证载体中插入单拷贝的寡聚核苷酸。
7. Midiprep 验证克隆后，制备一定质量和数量的 DNA，按标准程序，构建报道细胞系。

### 构建 GFP 报道细胞系

由于 HEK-293 细胞容易生长和转染，因此我们在该细胞中构建报道细胞系。下面描述了我们利用电转化仪构建 293 GFP 基因靶向细胞系的方法。

8. 在 10cm 培养板上，用全 DMEM 培养 HEK-293 细胞（不是对 G418 已经耐受的 HEK-293-T 细胞），使其长到对数生长期。
9. 消化细胞，并用 10ml 无血清的 DMEM 洗一次。用无血清的 DMEM 重悬细胞，细胞密度为 $10^6$ 个/ml。
10. 取出 400μl 细胞，将它与 10μg 超螺旋的报道质粒混合。

    我们发现，用该比例时，细胞系含有单拷贝的整合体。
11. 将细胞在冰上孵育 5min，接着在 BTX ECM399 电转化仪上以 150V 进行电转化。
12. 将细胞在冰上恢复 5min，接着转移到预先加入 10ml 全 DMEM 的 10cm 培养板中。
13. 第二天，加入 G418，使其终浓度为 500μg/ml 开始筛选。
14. 以该培养基培养细胞，每 3～4 天换液一次，动作轻柔以免破坏正在形成的克隆。
15. G418 筛选 2 周后，单个克隆都已经很明显。通过选择单克隆产生一个单克隆报道细胞系，并分析每个克隆细胞表面人 CD8α（CD8）基因的表达情况。鉴定出 CD8 在细胞表面具有稳定高表达的克隆，并作为报道细胞系。

简单测定 ZFN 时，一个多克隆群体已经足够。以下步骤简要描述了如何产生一个多克隆群体。

16. 在第 2 周，瞬时消化培养板上的细胞而不去除细胞表面的 CD8。
17. 用 10ml MACS 缓冲液洗涤消化下的细胞，接着用 100μl MACS 缓冲液重悬。
18. 用 Miltenyi 的磁珠分选系统，利用 CD8 微球纯化 $CD8^+$ 细胞。

我们发现 G418 耐受克隆中有 30%～50%的 $CD8^+$。通常该 $CD8^+$ G418 耐受的多克隆群体（称为“ZFN 报道系”）足以定量测定新设计的 ZFN。

### 利用新的 GFP 报道细胞系通过磷酸钙转染测定新的 ZFN

19. 转染前一天，将 ZFN 报道系按 $10^5$/孔用全 DMEM 铺在 24 孔培养板上。铺 12 个孔。
20. 转染前，将培养基替换成 500μl 全 DMEM。
21. 按磷酸钙转染步骤，将以下质粒转染每个孔。
    - 孔 1：200ng GFP 表达质粒＋200ng I-*Sce*I 表达质粒
    - 孔 2～4：200ng GFP 修复供者质粒（RS2700 质粒)＋200ng I-*Sce*I 表达质粒
    - 孔 5：200ng GFP 表达质粒＋100ng GFP-ZFN1＋100ng GFP-ZFN2
    - 孔 6～8：200ng GFP 修复供者质粒（RS2700 质粒）＋100ng GFP-ZFN1＋100ng GFP-ZFN2
    - 孔 9：200ng GFP 表达质粒＋100ng Zif-ZFN 表达质粒＋100ng 新 ZFN 表达质粒
    - 孔 10～12：200ng GFP 修复供者质粒（RS2700 质粒）＋100ng Zif-ZFN 表达质粒＋100ng 新 ZFN 表达质粒
22. 将磷酸钙/DNA 沉淀在细胞表面孵育 8～16h。
23. 去除培养基和沉淀，替换成 1ml 全 DMEM。
24. 转染后 66～78h，瞬时消化细胞，并用 1ml FACS 缓冲液洗涤。重悬在 400μl FACS 缓冲液中。
25. 用流式细胞仪分析细胞中 GFP 的表达情况。
26. 用转染效率（从孔 9 测得）校正实验条件下 GFP 阳性细胞的比率（孔 10～12 的平均），从而测定基因靶向的比率。用 I-*Sce*I 的靶向效率（从孔 1～4 测得）或者用 GFP-ZFN 的靶向效率（从孔 5～8 测得）校正 ZFN 的靶向效率，将新 ZFN 的活性与其他 ZFN 进行比较。

在该系统中，没有双链断裂的靶向背景比率为百万分之一。

## 疑难解答

问题：存在多个潜在的 ZFN 全位点可以选择。

解决方法：利用识别全 5′-GNN-3′、5′-ANN-3′和 5′-CNN-3′三联体的锌指数据库，可以得到目的基因中多个潜在的 ZFN 全位点。虽然已经有鉴别哪个位点比其他位点更好的计算方法产生，但是这些计算方法都还处于初始发展阶段，还没有被系统地验证和测定，而且还没有发表。因此，目前还没有更好的机制从中选择一个位点，只能选择富含 5′-GNN-3′三联体的位点。

问题：ZFN 全位点与预期靶点的合适距离为多少。

解决方法：Jasin 和 Nickoloff 实验室的工作已经表明靶向频率随着离双链断裂位点的距离而降低。接近双链断裂位点时，靶向频率为 100%，但与断裂位点相距 100bp 时，靶向频率降低到 20%，当与断裂位点相距 1kb 时，降低到 1%～5%（Elliott et al. 1998）。我们的工作已经表明，能够在距离 ZFN 诱导的双链断裂位点高达 500kb 处插入 1000kb（Porteus 2006）。因此，选择的 ZFN 切割位点应尽可能地接近预期的靶点。

## 致谢

M. H. P. 感谢 Burroughs-Wellcome fund 和 University of Texas Southwestern Medical Center 对他实验室所做研究的支持。M. H. P. 实验室的工作还得到了 NIH 基金 k08 HL70268 的支持。

## 参考文献

Alwin S., Gere M.B., Guhl E., Effertz K., Barbas C.F., III, Segal D.J., Weitzman M.D., and Cathomen T. 2005. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol. Ther.* **12:** 610–617.

Buerstedde J.M. and Takeda S. 1991. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* **67:** 179–188.

Capecchi M. 1989. Altering the genome by homolgous recombination. *Science* **244:** 1288–1292.

Dreier B., Segal D.J., and Barbas C.F., III. 2000. Insights into the molecular recognition of the 5′-GNN-3′ family of DNA sequences by zinc finger domains. *J. Mol. Biol.* **303:** 489–502.

Dreier B., Beerli R.R., Segal D.J., Flippin J.D., and Barbas C.F., III. 2001. Development of zinc finger domains for recognition of the 5′-ANN-3′ family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* **276:** 29466–29478.

Dreier B., Fuller R.P., Segal D.J., Lund C.V., Blancafort P., Huber A., Koksch B., and Barbas C.F., III. 2005. Development of zinc finger domains for recognition of the 5′-CNN-3′ family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* **280:** 35588– 35597.

Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., and Chandrasegaran S. 2005. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **33:** 5978–5990.

Elliott B., Richardson C., Winderbaum J., Nickoloff J.A., and Jasin M. 1998. Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **18:** 93–101.

Jasin M. 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* **12:** 224–228.

Kim Y.G., Cha J., and Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 1156–1160.

Liu Q., Xia Z., Zhong X., and Case C.C. 2002. Validated zinc finger protein designs for all 16 GNN DNA triplet targets. *J. Biol. Chem.* **277:** 3850–3856.

Pabo C.O., Peisach E., and Grant R.A. 2001. Design and selection of novel $Cys_2His_2$ zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70:** 313–340.

Pavletich N.P. and Pabo C.O. 1991. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252:** 809–817.

Porteus M.H. 2006. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol Ther.* **13:** 438–446.

Porteus M.H. and Baltimore D. 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* **300:** 763.

Porteus M.H. and Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **23:** 967–973.

Segal D.J., Dreier B., Beerli R.R., and Barbas C.F., III. 1999. Toward controlling gene expression at will: Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5′-GNN-3′ DNA target sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 2758–2763.

Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., Dreier B., Effertz K., Huber A., Koksch B., Lund C.V., Magnenat L., Valente D., and Barbas C.F., III. 2003. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry* **42:** 2137–2148.

Smith J., Berg J.M., and Chandrasegaran S. 1999. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. *Nucleic Acids Res.* **27:** 674–681.

Smith J., Bibikova M., Whitby F.G., Reddy A.R., Chandrasegaran S., and Carroll D. 2000. Requirements for double-strand DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* **28:** 3361–3369.

Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., and Holmes M. C. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435:** 646–651.

Wolfe S.A., Nekludova L., and Pabo C.O. 2000. DNA recognition by $Cys_2His_2$ zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29:** 183–212.

# 第四篇　基因和载体转运的专门技术

# 第六十七章　基于细菌人工染色体的人类人工染色体的重新装配

Joydeep Basu 和 Huntington F. Willard

Institute for Genome Sciences and Policy, Duke University, Durham, North Carolina 27708

赵萌　译



## 摘要

成功的基因转导需要有效的转运和外源基因的长期存在，才能使生理相关和被恰当调控表达的治疗基因在受体靶细胞内得以维持。最佳的基因转运平台应该具有无限的有效载荷能力而且不与受体基因组整合。而且应该在受体细胞内形成自主复制元件，长期调控基因表达。尽管一些潜在的可行方法已经被开发，但是要满足上述要求，可能仍需要特定的、克隆的和有功能的染色体元件重新组装成人人工染色体（HAC）来达成(Basu and Willard 2005)。

## 引言

为了保证能在有丝分裂时正确分离，HAC 必须含有着丝粒。着丝粒是负责形成介

导黏附和染色体沿纺锤体运动的蛋白质 DNA 复合物，即着丝点的染色体顺式作用元件（Cleveland et al. 2003；Amor et al. 2004）。在人体中，着丝粒的 DNA 构成包含 α-卫星 DNA，一个大约 171bp 单体单元的分级组织重复元件，它串联存在于所有正常人染色体着丝粒的几千 kb 的碱基上（Rudd and Willard 2004）。由 Harrington 等首先阐述的构建和操作合成 α-卫星序列重新形成着丝粒的方法为 α-卫星 DNA 对着丝粒活性的影响提供了明确证据（1997）。

尽管“人工染色体”这个词语已经被用来含糊地代表多种工程微染色体平台（Basu and Willard 2005），但是最严格讲来，它应该与 20 年前在 *Saccharomyces cerevisiae* 构建的酵母人工染色体（YAC）相同（Murray and Szostak 1983），用来描述特定的、结构确定的染色体重新组建形成的实体。和 YAC 载体相同，HAC 具有清晰确定的着丝粒，复制起点和相应的末端着丝粒，它们全部被克隆进一个合适的载体骨架中，通常是细菌人工染色体（BAC）载体，也可用 YAC 和 PAC（P1 基础上的人工染色体）载体。BAC 基础上的人工染色体可是线性也可是环状的（Ebersole et al. 2000）。它至少需要一个哺乳动物的选择标记和一个克隆的可起源于天然或合成的 α-卫星序列来引导着丝粒重新合成。正如 Basu 等（2005a，b）和 Kotzamannis 等（2005）所表述的，能够操纵包含多个大片段（＞100kb）重复序列的 BAC 的重组基因技术的发展证实了构建单分子的 BAC 基础上的载体的可行性。

证明克隆的 α-卫星 DNA 可以重新形成着丝粒（Basu and Willard 2005）是证实 HAC 技术可行的重要一步。虽然具有不同的效率，合成的和在数个人染色体基因序列中的 α-卫星 DNA 都被证明可以使着丝粒重新形成（Harrington et al. 1997；Ikeno et al. 1998；Grimes et al. 2002；Basu et al. 2005b；Kaname et al. 2005）。还没有发现除 α-卫星以外的序列具有重新形成着丝粒的能力。也没有发现造成这种区别的 α-卫星 DNA 的分子或基因组特性。近期优化 HAC 形成的方法主要集中在调整 α-卫星 DNA 内 CENP-B 盒的密度和分布来增加着丝粒的重新形成。CENP-B 盒是序列为“PyTTCGTTGGAAPuCGGGA”的基序，为组成型着丝粒蛋白 CENP-B 结合人 α-卫星 DNA 所必需。在使合成的 α-卫星序列中 CENP-B 盒的密度和分布呈系统性变化的系列实验，明确表明了 CENP-B 盒的密度和着丝粒重新形成之间有联系（Ohzeki et al. 2002；Basu et al. 2005b）。而且，在体内发现的在上游或者下游含有额外 CENP-B 盒的序列能够更有效的重新形成着丝粒（Basu et al. 2005b）。

从生物技术的角度，构建 HAC 的最终目标是转运一个有治疗作用的人基因，然后使其在恰当方式调控下在相对易感细胞中表达。在几个证实性研究中，一个包含 HPRT 基因大约 150kb 片段的环状 BAC 与一个或存在于同一个载体上（Mejia et al. 2001）或在单独的 BAC 上共转染（Grimes et al. 2001）的 α-卫星序列一起，可以使 HPRT 基因表达，证明了人类基因可以在人工染色体中表达。共转染的方法也被用来构建了表达 *GCHI* 基因座的人工染色体（Ikeno et al. 2002）。而且，我们实验室最近报道了整合了全部 200kb β-珠蛋白基因座的定制 HAC 可表达 β-珠蛋白基因（Basu et al. 2005a）。我们也构建了分别携带 159kb 人生长因子和 208kb 多囊肾病 I 基因座基因组片段的人工染色体（Basu et al. 2005a）。

在考虑现在的 HAC 方法在基因治疗方面的潜在应用时，应该评价现在所应用的不

同方法的缺点和教训。表1比较了HAC重新装配的不同载体系统。如下是重新装配的HAC要成为能够实际应用的基因转导系统仍需要解决的基本技术困难。

**表1. 人人工染色体重新装配的不同方法**

| | 构成 | 载体 | α-卫星 | 基因组DNA | 方法 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 双分子 | BAC | 合成-17 | 100～200kb(确定的) | 着丝粒BAC与基因组BAC连接(Basu et al. 2005a) |
| 2 | 单分子 | BAC | 天然-21 | 156kb HPRT | *E. coli*中多步骤基因重组装配(Kotzamannis et al. 2005) |
| 3 | 单分子 | BAC | 合成-17 | 100～200kb(确定的) | α-卫星转座进入目标基因组BAC(Basu et al. 2005b) |
| 4 | 单分子 | BAC | 天然-17 | 160kb HRPT | *E. coli*中Cre/lox介导的装配(Mejia and Larin 2000; Mejia et al. 2001) |
| 5 | 单分子 | BAC | 合成-17 | 无 | 用传统的克隆方式装配(Grimes et al. 2002; Rudd et al. 2003) |
| 6 | 不同种属 | PAC | 天然-21 | 140kb HRPT | 与PAC混合直接转染HT1080(Grimes et al. 2001) |
| 7 | 不同种属 | BAC | 天然-21 | 180kb GCH1 | 与BAC混合直接转染HT1080(Ikeno et al. 2001) |
| 8 | 单分子 | YAC | 天然-21 | 无 | 酵母内基因重组组装(Ikeno et al. 1998) |
| 9 | 不同种属 | BAC | 合成-17 | 随机剪接 | 特定组分非同源重组后直接转染HT1080(Harrington et al. 1997) |

• 大小和构成成分：迄今为止，一般的重新装配的染色体在2～5Mb，由放入的DNA组分随机连接。

• 细胞系特异性：迄今为止，HAC只能在纤维肉瘤细胞系HT1080和其他永生细胞系（293、HeLa）中装配产生。

• 种属特异性：克隆的α-卫星DNA只能在人细胞系中重新装配形成着丝粒。合成小鼠人工染色体需要构建和评估合成的小鼠微卫星序列能否重新装配形成着丝粒。

## 方案1

## α-卫星BAC转染HT1080细胞

HAC的重新装配至少需要一个有克隆的或合成或天然的α-卫星序列的BAC或YAC，并且其中应该包含哺乳动物选择性标记（如新霉素、嘌呤霉素或杀稻瘟菌素抗性）。本方案介绍了用含大（>50kb）α-卫星序列的BAC载体转染哺乳动物细胞的方法。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

BAC DNA

用 QIAGEN-tip 500 柱来提取无内毒素的 BAC DNA。然后用去内毒素水重悬浮 BAC DNA 至浓度为 0.5～1.0μg/μl。

胎牛血清（FBS；Hyclone）

FuGENE-6（Roche）

商品化的 DNA 转移系统，包括转染试剂和电穿孔装置，都是根据小报道质粒（<5kb）的转染效率进行评估的。几乎没有关于传递高分子质量（>100kb）DNA 的效率的数据。在我们的实验中，以小 DNA 为基础做优化的平台不一定能很好地传递大分子 BAC。我们测试了大部分可获得的知名的商品化的转染试剂；在我们的实验条件下，FuGENE-6 试剂（Roche）在传递大分子 DNA 方面最有效而且可直接使用，毒性小。我们也对 Lipofectamine 2000（Invitrogen）进行了实验，但是发现其方法繁琐，特别是处理多个转染时。

G418（50mg/ml；Mediatech）<!>

HT1080 纤维肉瘤细胞系

HT1080 的培养液是含 10% FBS 的 αMEM，补加 50μg/ml 的庆大霉素（GIBCO）。

基本培养基，Alpha（αMEM），补加 L-谷氨酸（如 Cellgro 或 GIBCO）

嘌呤霉素（10mg/ml；Invitrogen）<!>

### 仪器

克隆环

标准组织培养设备，包括 100mm 培养皿及 T-25 烧瓶

## 方法

### α-卫星 BAC 转染 HT1080 细胞

1. 在转染前一天，用充足的 HT1080 细胞铺 100mm 组织培养皿，使第二天能够达到 50%～75%的覆盖率。每个转染的 DNA 需要至少铺两个培养皿。
2. 在灭菌的 1.5ml 离心管中加入 100μl 无血清的 αMEM 和 4～6μg DNA，每个培养皿一管。在其中慢慢加入 15～20μl FuGENE-6 试剂，轻弹管壁混合。仔细观察溶液中是否存在白色沉淀。如果存在，用宽孔吸头慢慢打散。

   在我们的实验条件下，当 FuGENE-6∶DNA（体积∶质量）为 3∶2 时转染大型 BAC 的效果最好，但是每个实验室都应该优化这个比值。需要小心的是，虽然超螺旋高分子质量的 BAC 对剪切破坏力很有耐受性，但是线性高分子质量 DNA 非常敏感。

3. 室温下孵育 FuGENE/DNA 混合液 30～45min，其间轻弹管壁混匀。确定没有沉淀形成。

4. 用宽孔吸头将 FuGENE/DNA 混合液轻轻加入 HT1080 细胞中，持续振摇培养皿使其均匀分布。

5. 37℃孵育过夜

6. 第二天，吸出培养皿中的培养液，加入合适的选择培养基（如含有 3μg/ml 嘌呤霉素或 600μg/ml G418 的培养基)。

G418 也被称为新霉素或 geneticin 抗生素，不要与庆大霉素（gentamycin）混淆！

7. 在克隆形成后，至少挑 25～30 个克隆做进一步分析。用克隆环将单个克隆转移到 T-25烧瓶中。每 3～5d 更换新的选择培养基。形成肉眼可见的克隆需要 10～14d。当转移单个克隆时，接种另外一个 T-25 或 T-27 板冰冻以长期储存。

## 方案 2

# 用 FISH 法鉴定 HAC 重新形成

方案 2 和 3 介绍了从实验方案 1 获得的克隆细胞系中鉴定 HAC 的两步细胞学方法。在第一步骤中（方案 2)，由于在 BAC 载体中自主元件含有 α-卫星序列，我们以 α-卫星为探针用原位荧光杂交法（FISH）确定 HAC 的假定存在。在第二步骤中（实验方案 3)，免疫-FISH 显示了主要着丝粒特异抗体如着丝粒特异组蛋白 H3 变异体 CENP-A 的存在（Amor et al. 2004)，从而证明了 BAC 载体特异杂交和有功能的着丝粒的形成，确实了着丝粒的重新形成。

为了简短，本方案假定一个合成的或天然的染色体-17 基础上的 α-卫星序列已经使着丝粒形成。染色体-17 基础上的 α-卫星 DNA 已经被证明可以有效地介导着丝粒的重新形成，而且没有检测到其整合目标细胞的序列元件（Harrington et al. 1997；Rudd et al. 2003；Basu et al. 2005a，b)。其他染色体起源的 α-卫星序列也可以执行着丝粒重新形成的功能（Kaname et al. 2005)。在这种情况下，与所选 α-卫星互补的 FISH 探针应该被如下所述的 Vysis CEP-17（或同等非商品化的）探针取代。

### 材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

乙酸<！>
CEP-17 α-卫星探针（Vysis）或同等非商品化探针
Colcemid 溶液（10μg/ml；KaryoMAX，GIBCO）<！>
乙醇（70%、80%和 100%；储存在－20℃）<！>
甲酰胺（Chemicon International）<！>
$H_2O$，Milli-Q 处理（特级纯）
HT1080 纤维肉瘤细胞，用 BAC DNA 转染，在 T-25 烧瓶中长成单克隆（见方案 1）
Hybrisol VII（Qbiogene）

KCl（0.075mol/L）<!>

　　将 5.59g KCl 溶解在 1L 双蒸水（$ddH_2O$）中形成低渗溶液。用 0.22μm 滤膜过滤除菌。用之前预热到 37℃。

甲醇（100%）

甲醇/乙酸溶液（3∶1 *V/V*）

加入 DAPI<!>（Vectashield，Vector 实验室）的 Mounting 培养液（防退色）

磷酸盐缓冲液（PBS）

20×SSC

　　将 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠<!>溶解在 800ml 水中，用 14mol/L HCl<!>调节 pH 到 7.0。加水至 1L。充分溶解高压灭菌。用前稀释。

胰岛素（0.05% 溶解液）<!>

### 仪器

装备相差镜头的 Benchtop 型显微镜

医用离心机

Coplin 细胞培养用广口瓶

盖片（1 号，各种大小；Fisherfinest，Fisher Scientific）

荧光显微镜

湿度调节器

显微载玻片（Fisher Scientific 12-550-43）

Pasteur 吸管（9in，玻璃；Fisher 13-678-20D）

标准组织培养装置，包括 15ml 圆管和 T-25 烧瓶

水浴，预热到 37℃

## 方法

### 用于染色体扩散的克隆细胞系的准备

1. 当 T-25 烧瓶中的 HT1080 克隆（见方案 1）细胞接近长满时，向每个烧瓶中加入 16.5μl colcemid 溶液。在 37℃孵育 40～60min。观察是否有圆形的分裂期细胞。
2. 在 37℃的水浴中预热 50ml 0.075mol/L KCl。每个细胞株标记一个 15ml 圆形管备用。
3. 将表面细胞转移至圆形管中。用 PBS 清洗烧瓶吸去多余液体。
4. 向每个 T-25 烧瓶中加入 1ml 胰岛素溶液。37℃孵育至细胞分离。将表面细胞重新加入烧瓶中，用力吹打以悬浮细胞，将悬浮细胞转移到圆形管中。
5. 室温下用医用离心机 1500～2000r/min 离心圆形管 5～10min。
6. 吸去细胞沉积物上的水。在每个管中边摇晃边加入 10ml 0.075mol/L KCl。室温下盖上组织培养盖孵育 12min。按步骤 5 中的条件离心。在我们的实验条件下，孵育 HT1080 的最理想时间是 12min。也可以做一些优化。
7. 吸去细胞沉积物上的水。轻弹管壁重悬浮细胞以避免细胞丛生。

8. 逐滴加入 1ml 3∶1（$V/V$）的甲醇/乙酸溶液固定细胞。再另外加入 4ml 甲醇/乙酸达到 5ml。颠倒圆形管。
9. 按步骤 5 中的条件离心。在染色体扩散之前，可在－20℃的甲醇/乙酸溶液中保存细胞沉淀物。

## 准备用于 FISH 的染色体扩散

众所周知，用于 FISH 的高质量的染色体扩散易受实验室环境因素和操作者的经验的影响。此过程的很多方面都可以更多的说是一项“艺术”，不同的实验室可能会应用不同的实验方案。下面的实验方案只是初步的框架，每个实验室可以根据自身环境做调整和优化。

在一个小密闭，且湿度可以控制的房间里进行染色体“降落”试验。比如，可以在降落步骤进行前几小时打开 2～3 个水浴和湿度调节器。

10. 把固定的细胞从－20℃中取出（见步骤 9）。室温下用医用离心机 1000～2000r/min 离心 5～10min 沉积细胞。吸去多余的固定液，轻弹管壁重悬浮细胞。
11. 配置新鲜的固定液（30ml 甲醇＋10ml 乙酸），放置到降落室中。在放满 100% 甲醇的 Coplin 广口瓶中放置几个新的显微载片。
12. 用 Pasteur 玻璃吸管加入足够的新鲜固定液重悬浮细胞，使溶液轻微混浊，但是仍可以看清吸管。
13. 擦干一个显微载片，用力吹向载片至少 3 次使其潮湿；在载片的降落面形成可见的雾化状态。把载片拿到与腰齐平，玻璃吸管与肩水平。确保细胞在充分悬浮状态（一定不能成团！）在载片上滴 1～2 滴细胞悬浮液。
14. 用力吹向载片表面至少 3 次使其潮湿。在湿度调节器的气流上放置载片至少 10s。再向降落面吹 3 次保持潮湿状态。垂直晾干。如果需要可用无棉纸擦拭载片背面。不要让载片太靠近湿度调节器。只要维持其潮湿状态即可，不能形成液滴。
15. 载片干燥后，用相差显微镜和 20×目镜观察扩散状态。染色体应该是干净的，呈暗色均一状态，有很好的延展状态，但是可清晰看出是由一个细胞裂解而形成的。如果染色体的扩散状态不佳，可以尝试在固定液中直接加入乙酸再重复。或者尝试从更高高度滴落，把甲醇∶乙酸调整为 1∶1，升高或者降低环境湿度。
16. 向残留的细胞中加入 10ml 新鲜固定液，用医用离心机 1000～2000r/min 离心 5～10min。用之前可以在－20℃固定液中储存细胞。
17. 把载玻片放在工作台或真空柜中过夜彻底干燥。在杂交之前，载玻片需在干燥器中储存 1～14d。

## α-卫星探针杂交染色体扩散

18. 在 37℃水浴中，把扩散干燥好的载玻片放入 2×SSC 中孵育 30～90min。
19. 将预冷的 70%乙醇（在－20℃储存）装入 Coplin 广口瓶中拿到水浴前，在－20℃执行如下系列乙醇洗涤使染色体扩散脱水。

    a. 70% 乙醇洗 2min。

b. 80% 乙醇洗 2min。

c. 100% 乙醇洗 2min。

d. 把载玻片从乙醇液中取出，一次一片。用无棉纸吸干背部水分。

e. 放置在工作台上干燥 10min。

20. 72℃在 70% 甲酰胺/2×SSC（pH7.0）溶液中洗载玻片 2min 变性样品。重复步骤 19 的乙醇洗涤过程。将预冷的 70% 乙醇装入 Coplin 广口瓶中拿到 72℃水浴前。放置在工作台上干燥 10min 或过夜。
21. 在 20μl Hybrisol VII 中加入 0.5μl Vysis CEP-17 探针（或同等的非商品化探针），为每个预备杂交的载玻片准备一管。72℃变性 5min 后放置在冰上。
22. 将变性的探针直接加到每个载玻片上，盖上盖玻片。不要用橡皮泥或者指甲油封闭。在潮湿的盒子中孵育过夜（如放入湿的纸手帕的塑料盒；用两个 10ml 吸管作为载玻片的支架）。
23. 第二天，按如下步骤洗涤载玻片。在第一步洗涤中除去盖玻片。

    a. 42℃在 65% 甲酰胺/2×SSC（pH7.0）中清洗载片 8min（更高层次的 α-卫星序列要进行更严格的清洗）

    b. 用新鲜的 65% 甲酰胺/2×SSC（pH7.0）重复清洗。

    c. 37℃在 2×SSC 中清洗 8min。

    d. 用 Coplin 光口瓶装满 Milli-Q 处理水冲洗载玻片。甩掉多余的水分，用无棉纸吸干背部水分。
24. 在潮湿的载玻片上加上 20～40μl DAPI/防脱色 mounting 培养液（Vectashield）。用 P20 吸管头轻轻将 1 号 22×50 盖玻片放置在每个载片上。轻轻地用无棉纸吸干盖片表面多余的 mounting 培养基。用指甲油封闭盖片边缘。在荧光显微镜观察之前，把玻片在室温下放置在暗玻片盒里至少 2h。4℃长期储存。

## 方案 3

# 确定 HAC 上的着丝粒重新形成

在鉴定了含有候选人工染色体的克隆细胞系之后，下面的方案可进一步鉴定含有有功能的着丝粒和 BAC 载体特异序列的染色体外元件。本方案的基础是联合 FISH/免疫细胞化学技术，它用 BAC 载体特异的 FISH 探针和 CENP-A 特异抗体来证明有功能的着丝粒的存在。图 1（见彩版）是重新形成的 HAC 的鉴定和上述技术的应用的例子。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Colcemid 溶液（10μg/ml；KaryoMAX，GIBCO）

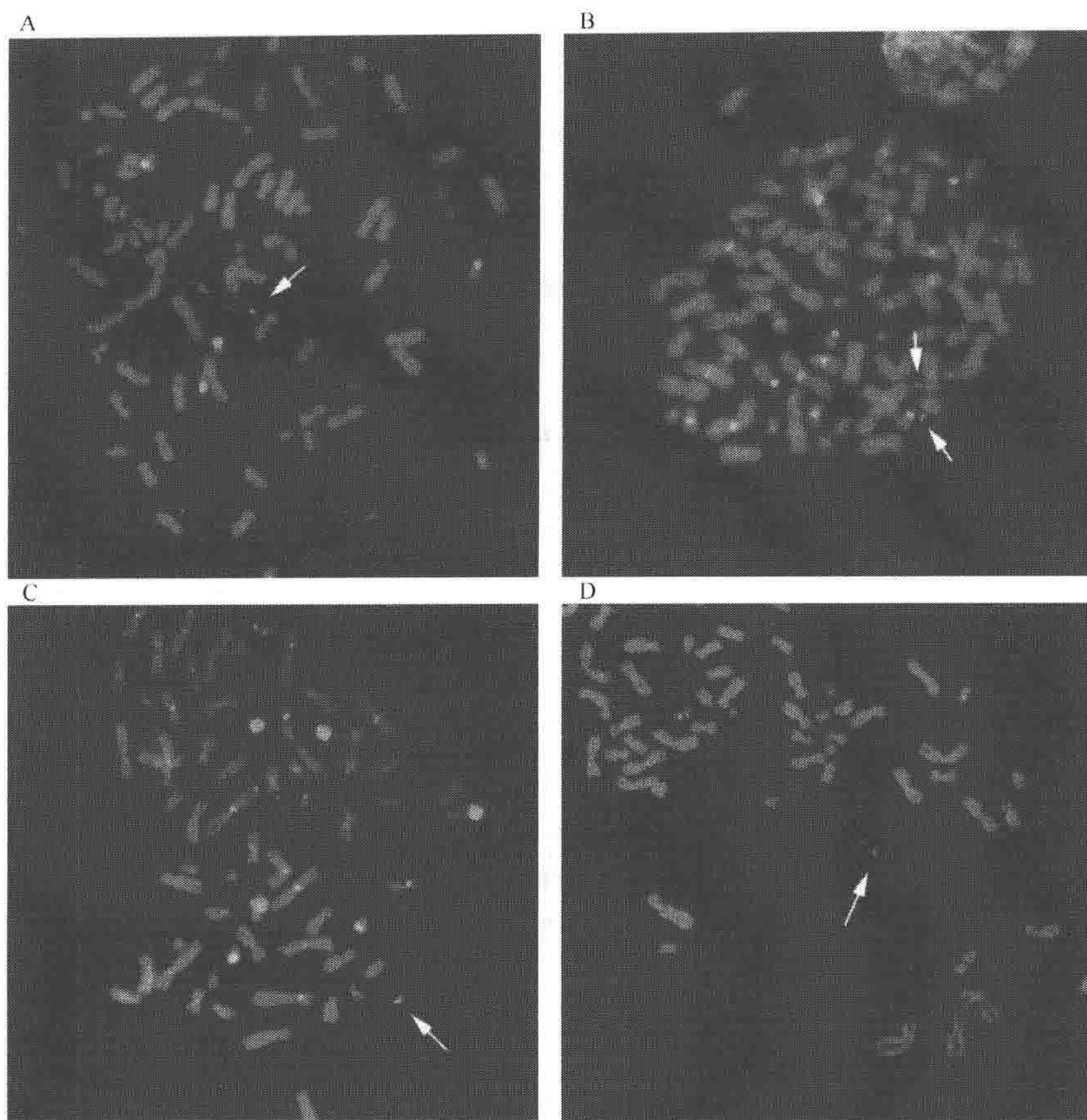



图 1. 含有β-珠蛋白基因座的 HAC 载体重新形成的细胞学验证。A. 用 D17Z1 α-卫星（Vysis CEP-17）（绿色）和 BAC 载体（红色）的 FISH 实验。B. 用 D17Z1 α-卫星（Vysis CEP-17）（绿色）和β-珠蛋白基因座（红色）的 FISH 实验。C. 用 D17Z1 α-卫星（Vysis CEP-17）（绿色）和端粒 DNA 的 FISH 实验。D. 用 D17Z1 α-卫星（Vysis CEP-17）（绿色）和抗-CENP-C（红色）的免疫 FISH 实验。在所有情况下，DNA 是蓝色的（DAPI）。箭头指向重新形成的 HAC。在公开发表的情况下，由 Basu 等（2005b）重复实验。

乙醇（70%、80%和 100%；－20℃储存）

FISH 探针（见方案 4）

甲醛（4%）PBS/0.2% Triton X-100

48ml PBS

2ml 37%甲醛<!>

100μl Triton X-100<!>

甲酰胺（Chemicon International）

HT1080 纤维肉瘤细胞，用 BAC DNA 转染，在 T-25 烧瓶中长成单克隆（见方案 1）

KCl（0.075mol/L）<!>

将 5.59g KCl 溶解在 1L 双蒸水（$ddH_2O$）中形成低渗溶液。用 0.22μm 滤膜过滤除菌。用

之前预热到 37℃。

甲醇/乙酸溶液（3∶1 *V*/*V*）

加入 DAPI<!>（Vectashield，Vector 实验室）的 Mounting 培养液

磷酸盐缓冲液（PBS）

PBS/0.2% Triton X-100

一抗（抗 CENP-A 鼠单克隆抗体；Stressgen Biotechnologies）

二抗（如抗鼠 IgG/若丹明或者荧光素；Jackson Immunoresearch）

20×SSC

将 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠<!>溶解在 800ml 水中，用 14mol/L HCl<!>调节 pH 到 7.0。加水至 1L。充分溶解高压灭菌。用前稀释。

### 仪器

装备相差镜头的 Benchtop 型显微镜

医用离心机

荧光显微镜

Shandon Cytospin 4 cytocentrifuge（Thermo Electron）

Shandon Double Cytofunnels（Thermo Electron 5991039）

Shandon Double Cytoslide，包被的（Thermo Electron 5991055）

标准组织培养装置，包括 15ml 圆管和 T-25 烧瓶

## 方法

1. 在 T-25 培养瓶中培养挑好的克隆细胞系。长到 80%～90%满后，每瓶加入 25μl Colcemid 溶液。在 37℃孵育大约 45min。用显微镜观察圆形，分裂期细胞的产生。
2. 在 Colcemid 孵育过后，把每个培养瓶中的大部分培养液转移到 15ml 圆形管中。在工作台上用力敲打 T-25 培养瓶 15～20 次。用圆形管中的培养液冲洗新脱离的细胞，把培养液（和细胞）转移回 15ml 圆形管中。
3. 用医用离心机 2000r/min 4℃离心细胞 10min。吸走培养液，轻弹管壁使细胞在残余培养液中悬浮。
4. 边搅动边向每管细胞中逐滴加入 1ml 预热（37℃）的 0.075mol/L KCl。另外再加入 4ml 预热的 0.075mol/L KCl。将剩余的 0.075mol/L KCl 放置在冰上，37℃孵育细胞 12min。
5. 装配标记 Shandon Double Cytofunnels。用相应的为 Cytospin 设计的包被显微载片，每片上有两个点进行细胞沉积。
6. 室温用医用离心机 1000r/min 离心细胞 5min。轻轻倒出 0.075mol/L KCl。用 3ml 冰上预冷的 0.075mol/L KCl 重悬浮细胞。用转移吸管用力吹打确保全部悬浮。
7. 每个 Cytofunnel 加入 250～300μl 细胞悬液。室温下 200r/min 离心 10min。
8. 从 Cytospin 上移走载片，干燥 10min。但不要完全干燥。将载片在室温下 PBS/0.2% Triton X-100 中孵育 6min。

9. 用相差显微镜和 20×目镜观察染色体扩散状态。

染色体颜色应为亮色，与背景差别较小，所以有些难于观察到。如果可以看到几个扩散，就可以断定有很多未看到的扩散存在。如果扩散很密集，用更多的 0.075mol/L KCl 稀释细胞重复 Cytospin 步骤。

10. 室温下用 4% 甲醛/PBS/0.2% Triton X-100 固定细胞 10min。
11. 用 PBS 清洗载片 5min，立即用一抗（抗 CENP-A 鼠单克隆抗体，用 PBS 稀释）孵育。在每个载片上盖上盖片（不要封闭），37℃在潮湿的柜中孵育过夜。

    抗体的稀释浓度可以为 1/50～1/500。

12. 用 PBS 洗载片两次，每次 5min。
13. 每张载片加入 100μl 用 PBS1∶200 稀释的二抗（如抗鼠 IgG 与 FITC/TRITC 共价结合）。盖上未封闭的盖片，在潮湿的柜中 37℃孵育 1h。
14. 用 PBS 洗载片两次，每次 5min。
15. 室温下用 4% 甲醛/PBS/0.2% Triton X-100 固定样品 10min（见步骤 10）。
16. 用水洗载片两次，每次 5min。
17. 室温下用甲醇/乙酸溶液（3∶1 *V/V*）固定样品 15min。室温下在暗处干燥载片 5min。
18. 85℃在 70% 甲酰胺/2×SSC 中变性样品 14min。
19. 在一20℃执行如下系列乙醇洗涤脱水样品。
    a. 70% 乙醇洗 2min。
    b. 80% 乙醇洗 2min。
    c. 100% 乙醇洗 2min。
    d. 室温下在暗处干燥载片。
20. 当步骤 19 中 80% 乙醇脱水步骤开始时，85℃孵育 FISH 探针 5min 变性（见方案 4）。使用前在 37℃储存。
21. 每个细胞圈加 7～10μl 探针，盖上 22mm×22mm 正方形盖片（不要封闭）。在 37℃潮湿的柜子中（如放入湿的纸手帕的塑料盒；用两个 10ml 吸管哦作为载玻片的支架）孵育过夜。
22. 42℃用 50% 甲酰胺/2×SSC 洗载片两次，每次 10min。然后 42℃在 2×SSC 洗载片 10min。
23. 擦干每张载片的背面。每张载片加 3 滴 8μl Vectashield，盖上 1 号 24×50 盖片。用指甲油封闭盖片边缘。在荧光显微镜观察之前，可在 4℃储存。

## 方案 4

## FISH 探针的准备

此实验过程可标记大约 1μg 的 BAC DNA。足够做 10 次 FISH 实验（我们的目标区域大概是 22mm×22mm）。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法请见附录。

### 试剂

BAC DNA 模板

用 Tris-EDTA（10mmol/L Tris、1mmol/L EDTA，pH8.5）缓冲液准备浓度为 0.2μg/μl 到 1μg/μl 的电泳级 BAC 载体骨架 DNA 溶液。

COT-1 DNA（Invitrogen）

dNTP 混合液（0.1mmol/L）

混合 10μl 0.3mmol/L dATP、0.3mmol/L dCTP 和 0.3mmol/L dGTP。

dTTP（0.1mmol/L）

在 20μl 无核酸酶的水中加入 10μl 0.3mmol/L dTTP。

dUTP（0.2mmol/L；SpectrumGreen，SpectrumOrange，或 SpectrumRed；Vysis）

在 40μl 无核酸酶的水中加入 10μl 0.3mmol/L dUTP。

乙醇（100%）< !>

$H_2O$（无核酸酶）

人胎盘 DNA（Sigma-Aldrich）

Hybrisol VII（Qbigene）

nick Translation Kit（Vysis）

乙酸钠（3mol/L，pH5.2）

### 仪器

琼脂糖凝胶电泳标准器材，包括分子质量标记

## 方法

### 标记探针

1. 把一个离心管放置在冰上冷却。
2. 已下面列表的顺序在其中加入如下组分。在加酶之前轻微离心涡旋。

   17.5～xμl 无核酸酶水

   x μl 提出的 DNA（1μg）

   2.5μl dUTP（0.2mmol/L SpectrumGreen，SpectrumOrange 或 SpectrumRed）

   5μl dTTP（0.1mmol/L）

   10μl dNTP 混合液

   5μl 10×nick translation 缓冲液

   10μl nick translation 酶

   总体积 50μl

3. 轻微离心涡旋离心管。15℃孵育 8～16h。
4. 在 70℃水浴中加热 10min 终止反应。冰上冷却。

   随着酶量和孵育时间的延长，小的探针片段也随之增加。要想获得小的探针片段，可以应用如下条件（以片段大小逐渐减少为序）：5μl 酶混合物＋8h 孵育，5μl 酶混合物＋16h 孵育，10μl 酶混合物＋8h 孵育以及 10μl 酶混合物＋16h 孵育。调整无核酸酶水的量以控制反应总体积在 50μl。

5. 点样 10μl 用 2％的琼脂糖凝胶电泳检查探针的大小。大部分的探针应该在 300bp 附近。

## 沉淀探针

6. 把 5μl（约 100ng 探针）的切口平移反应混合液加入离心管。加入 1μg COT-1 DNA、2μg 人胎盘 DNA 和 4μl 纯水。加入 1.2μl（0.1 体积）3mol/L 乙酸钠（pH5.2），再加入 30μl（2.5 体积）100％乙醇沉淀 DNA。轻微涡旋在干冰上放置 15min。
7. 4℃，12 000r/min 离心 DNA 30min。
8. 移去上清，室温下真空干燥沉淀 10～15min。沉淀的探针可以以沉积状态储存在－20℃。
9. 在 10μl Hybrisol VII 中重悬浮沉淀。在使用之前，在 85℃水浴中加热 5min 变性（见方案 3，步骤 20）。重悬浮的探针可以在 4℃储存少于 2 周或－20℃未知时长。

## 参考文献


Amor D.J., Kalitsis P., Sumer H., and Choo K.H. 2004. Building the centromere: From foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.* **14:** 359–368.

Basu J. and Willard H.F. 2005. Artificial and engineered chromosomes: Non-integrating vectors for gene therapy. *Trends Mol. Med.* **11:** 251–258.

Basu J., Compitello G., Stromberg G., Willard H.F., and Van Bokkelen G. 2005a. Efficient assembly of de novo human artificial chromosomes from large genomic loci. *BMC Biotechnol.* **5:** 21.

Basu J., Stromberg G., Compitello G., Willard H.F., and Van Bokkelen G. 2005b. Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alpha-satellite arrays. *Nucleic Acids Res.* **33:** 587–596.

Cleveland D.W., Mao Y., and Sullivan K.F. 2003. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112:** 407–421.

Ebersole T.A, Ross A., Clark E., McGill N., Schindelhauer D., Cooke H., and Grimes B. 2000. Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum. Mol. Genet.* **9:** 1623– 1631.

Grimes B.R., Rhoades A.A., and Willard H.F. 2002. α-satellite DNA and vector composition influence rates of human artificial chromosome formation. *Mol. Ther.* **5:** 798–805.

Grimes B.R., Schindelhauer D., McGill N.I., Ross A., Ebersole T.A., and Cooke H.J. 2001. Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep.* **2:** 910–914.

Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K., and Willard H.F. 1997. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.* **15:** 345–355.

Ikeno M., Inagaki H., Nagata K., Morita M., Ichinose H., and Okazaki T. 2002. Generation of human artificial chromosomes expressing naturally controlled guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene. *Genes Cells* **7:** 1021–1032.

Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N.I., Cooke H., and Masumoto H. 1998. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat. Biotechnol.* **16:** 431–439.

Kaname T., McGuigan A., Georghiou A., Yurov Y., Osoegawa K., De Jong P.J., Ioannou P., and Huxley C. 2005. Alphoid DNA from different chromosomes forms de novo minichromosomes with high efficiency. *Chrom. Res.* **13:** 411–422.

Kotzamannis G., Cheung W., Abdulrazzak H., Perez-Luz S., Howe S., Cooke H., and Huxley C. 2005. Construction of human artificial chromosome vectors by recombineering. *Gene* **351:** 29–38.

Mejia J.E. and Larin Z. 2000. The assembly of large BACs by in vivo recombination. *Genomics* **70:** 165–170.

Mejia J.E., Willmott A., Levy E., Earnshaw W.C., and Larin Z. 2001. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **69:** 315–326.

Murray A.W. and Szostak J.W. 1983. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* **305:** 189–193.

Ohzeki J., Nakano M., Okada T., and Masumoto H. 2002. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J. Cell Biol.* **159:** 765–775.

Rudd M.K. and Willard H.F. 2004. Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends Genet.* **20:** 529–533.

Rudd M.K., Mays R.W., Schwartz S., and Willard H.F. 2003. Human artificial chromosomes with alpha-satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 7689–7697.

# 第六十八章　利用高压注射技术转运裸 DNA

David L. Lewis[*], Mark Noble[*], Julia Hegge[*] 和 Jon Wolff[†]

[*] Mirus Bio Corporation, Madison, Wisconsin 53719; [†] Department of Pediatrics Waisman Center, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53705

潘宇　译



## 摘要

在对动物细胞进行核酸转运和基因表达时常用的各种病毒或非病毒手段中，裸质粒 DNA 技术具有许多优点。首先，质粒 DNA 可通过 DNA 重组技术直接进行操作，对技术与设备无特殊要求；其次，此法即使用于大规模生产成本也不高；第三，由于质粒 DNA 无免疫原性，所以可多次给药也不会诱导抗体产生（Jiao et al. 1992）。与人们通常认识相悖的是，即使外源基因没有整合于染色体，通过裸质粒 DNA 技术仍可能使之在分裂或缓慢分裂细胞中得到长期表达（Wolff et al. 1992; Miao et al. 2000; Herweijer et al. 2001; Zhang et al. 2004）。尽管一直以来以非病毒途径转移核酸被认为是低效的，但通过血管内转运的裸 DNA 表达水平已接近以病毒为载体达到的水平。

## 引言

### 脉管系统的裸核酸转染

通过将 mRNA 或质粒 DNA 直接注射到骨骼肌中，人们发现了裸核酸能转染动物

体内细胞（Wolff et al. 1990）。接下来，人们发现除了骨骼肌细胞以外，心脏、胸腺、皮肤及肝脏组织都可表达外源基因（Acsadi et al. 1991；Kitsis and Leinwand 1992；Hickman et al. 1994；Sikes et al. 1994；Henggev et al. 1996；Yang and Huang 1996；Li et al. 1997）。在以上研究中，转染的细胞数有限，且基因表达也主要局限于注射部位。

研究者发现将大量的裸质粒 DNA 快速注射到小鼠门静脉后，外源基因可在肝细胞表达，由此核酸转移技术发展到通过血管内注射来完成（Budker et al. 1996）。于是外源基因在肝细胞的表达水平比之前通过直接注射转染的高出数个数量级（Hinckman et al. 1994）。之后的研究发现，快速注射大量 DNA 至小鼠与大鼠下腔静脉及胆管或狗胆管也可引起目的基因在肝脏的高水平表达（Zhang et al. 1977）。

小鼠尾静脉注射可以说是最常见的高压注射手段了。质粒 DNA 被注射入小鼠体内后，目的基因在肝脏中的表达水平最高，有 10%～40%肝细胞被转染。此外，肾、脾、肺、心等脏器也可检测到外源基因的表达，但表达水平往往比肝脏要低 2～3 个数量级（Liu et al. 1999；Zhang et al. 1999）。这种方法可能导致暂时的肝毒性。大鼠也可进行尾静脉注射（Maruyama et al. 2002）。

夹闭一侧肢体进出血管后，将质粒 DNA 通过高压注射注入大鼠和恒河猴髂动脉可使 DNA 有效转入骨骼肌（Budker et al. 1998；Zhang et al. 2001）。最近，静脉注射也被证明为转运质粒 DNA 和短干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）的高效手段（Hagstrom et al. 2004；Liang et al. 2004）。由于不需要外科操作，静脉注射比动脉注射更为简便易行。随着多途径联合注射的发展，转染细胞数量可进一步增加。

## 高压注射的应用

将裸核酸转入动物或动物疾病模型可阐明基因表达机制及其蛋白质在疾病发病机制中的作用，这使高压注射作为一种研究手段正得到越来越多的应用（Herweijer et al. 2001；Hodges and Scheule 2003）。例如，将质粒通过尾静脉高压注射至小动物模型表达有治疗前景的蛋白质，如生长因子、细胞因子、凝固因子、抗体等，从而可对这些蛋白质治疗效果或动物模型作用进行评价。DNA 或 RNA 的尾静脉高压注射使小鼠急性乙肝病毒和人丁肝病毒复制模型得以成功建立（Chang et al. 2001；Yang et al. 2002）。

肌肉的高压转基因注射同样有广泛应用。例如，编码抗肌萎缩蛋白的质粒曾被转入模型动物以期缓解肌萎缩症状（Zhang et al. 2004）。人为设计的分泌至血液中的蛋白质也被成功表达。尽管肌肉分泌蛋白质的效率不如肝脏等器官，但肌肉也可有效生成促红细胞生成素等高效蛋白质，这些蛋白质可在低浓度发挥其生物效应（Hagstrom et al. 2004）。

最后，高压注射质粒 DNA 可用于基因免疫以获得多克隆抗体或脾细胞，后者可用来制备产生单克隆抗体的杂交瘤细胞（Bates 2006）。本章介绍了用高压注射技术将质粒 DNA 注入小鼠和大鼠骨骼肌的方法。

## 方案1

# 通过尾静脉高压注射将质粒 DNA 输入小鼠肝脏

操作过程中，小鼠最好被有效固定，但不必麻醉，因为麻醉有时可致病。对于将质粒 DNA 输入大鼠肝脏的方法参见备选方案 1。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Ringer 溶液

用去离子水配制 10×储存液：0.85% NaCl、0.03% KCl<!>、0.03% $CaCl_2$<!>，过滤除菌；用无菌去离子水稀释为工作液后室温保存。

小鼠

主要用 ICR 或 C57BL/6 小鼠为实验动物。其他品系如 BABL/c，ddY 及转基因小鼠也可。

质粒 DNA

为保证最好的结果，质粒 DNA 需去内毒素。QIAGEN 等公司提供相应试剂盒提取去内毒素的质粒 DNA。含内毒素的质粒样本需用购买的去内毒素试剂盒处理。在提取质粒的最后步骤中避免使用含 Tris 的缓冲液，因为这些缓冲液有毒性。应正确选择质粒上的增强子、启动子等转录调控原件，因它们可影响转基因的表达数量及持续时间。如含病毒启动子的质粒（如巨细胞病毒早期增强子/启动子）可在转染肝脏初期高表达，但 24h 内表达即可终止。已有研究报道了含肝细胞内长期表达原件的质粒（Miao et al. 2000；Wooddell et al. 2005）。

### 仪器

锥形管（塑料，50ml；见步骤 1）

一次性注射器（3ml）

加热灯

注射针头（27 号）

## 方法

1. 将小鼠头朝里装于 50ml 锥形管中，管底有 3～5mm 呼吸孔，管盖上有裂口以使尾巴穿出。

   也可用购买的小鼠或大鼠专用固定管。

2. 注射前用热灯照射小鼠 10min 以扩张尾部血管。注意热灯位置，勿太近使小鼠过热。

   因尾静脉可见，所以保证了理想的注射效果。黑色小鼠尾静脉较难看见。可在尾部涂抹 70%异丙醇以增加血管和皮肤的反差。

3. 将质粒 DNA（通常 5～100μg，去内毒素）加入室温的无菌 1×Ringer 溶液。注射液总量大概为小鼠体重的 10%（如 20g 鼠注射 2ml）。

   注射量不足将造成质粒转入效果不佳。因会引起注射后综合征，不能用盐溶液作为注射液。注射量一定时可按比例增加或减少其中核酸的量。

4. 将 0.5in 长的 27 号针头装于 3ml 注射器，进针于扩张的尾静脉，最好位于尾部中间或靠近远端。

   注射时最好将针头全部插入血管以避免渗漏。

5. 先缓慢推入少量注射液以确保针头已打入血管。确保进针正确后，5～7s 内将所有液体注入尾静脉。

   是否能将注射液尽快匀速的推入动物血管对获得最大输入效率的有重要影响。注射完毕后动物可出现短时静止和呼吸困难，但一般不超过 15～20min。

## 备选方案 1

# 大鼠的尾静脉高压注射

本方案用于大鼠尾静脉高压注射，除下列少数步骤外大致于小鼠注射方案类似。

### 附加材料

**注意**：标有<！>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

异氟烷<！>

大鼠

热水（见步骤 4）

#### 仪器

蝶形输液器（21 号×3/4in 注射针头）

一次性注射器（60ml）

解剖显微镜

Harvard Apparatus PHD2000 注射泵

Surgvet/Anesco Isotec 4 流量计

### 方法

1. 将质粒 DNA（50～500μg，去内毒素）溶于 10%大鼠体重的无菌、室温 1×Ringer 溶液（如 120g 大鼠注射 12ml 液体）。

   如大鼠体重超过 200g，则适当减少注射量，总量不超过 18ml。

2. 60ml 注射器吸取注射液，并连于蝶形输液器（21 号翼状输液针头）。

3. 设置 Surgvet/Anesco Isotec 4 流量计，用1%～2%异氟烷（0.4L/min）麻醉动物。
4. 将鼠尾浸入热水中以扩张血管。

    可使静脉易见，有利于进针。

5. 在解剖显微镜下，将输液器尾端21号翼状输液针头斜角进针。将注射器置于设置好的 Surgvet/Anesco Isotec 4 流量计。
6. 先注入少量注射液以确保针头已打入血管。确保进针正确后，以注射泵最大注射速度（100ml/min）注入注射液。

    如注射泵不能用，也可用手动注射，但其效果可能受影响。

## 方案2

## 通过隐静脉高压注射将质粒DNA输入小鼠腿部肌肉

本操作用于将质粒 DNA 注入小鼠骨骼肌操作过程中。对于大鼠注射的操作方法参见备选方案2。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

异氟烷<!>

生理盐水

0.9% NaCl，用去离子水配制。滤过除菌，室温保存。

酮洛芬<!>或醋氨酚<!>（见步骤9）

小鼠

主要用ICR或C57BL/6小鼠为实验动物。其他品系如BABL/c、ddY及转基因小鼠也可。

质粒DNA

同尾静脉高压注射所用质粒DNA准备方法（方案1）。与肝脏不同，在肌肉长期表达的质粒可含有病毒或重组外源性增强子/启动子。注入后4～7d方可获得肌肉内最大表达效果。

#### 仪器

一次性注射器（10ml）

解剖显微镜料（可选）

镊子

凝胶发泡剂

Harvard Apparatus PHD 2000 注射泵

医用胶布

持针钳

剃刀

小牵引器

Surgvet/Anesco Isotec 4 流量计

外科线

注射器（30 号）

用 Drummel 工具磨光针头缩小外径。

止血带、止血钳

制作大鼠或小鼠止血带简单而有效的方法：剪下乳胶手套一指尖，再将其末端剪下 1cm 即可（见步骤 2）。

## 方法

1. 设置 Surgvet/Anesco Isotec 4 流量计，用 1%～2%异氟烷（0.4L/min）麻醉动物至手术所需深度。
2. 将待注射的动物下肢去毛，并用止血带扎住以阻止进出血流。将腿部穿入止血带直至近端被紧紧包住（只需部分套住腿四头肌近端）。拧紧止血带并用止血钳夹稳固定。用医用胶带将动物四肢固定于手术操作台，使动物保持仰卧位。

   核酸输送或到达区域与止血带的位置有一定关系。
3. 在腿部中央靠近踝处作一中线小切口，暴露大隐静脉。
4. 用 1.0ml 室温、无菌的生理盐水溶解质粒 DNA（通常 5～300μg，去内毒素）。

   此注射剂量对于 25g 动物最佳，但动物不同体重对于剂量影响不大。
5. 用 3ml 注射器吸取注射液，并连上 PE-10 导管。将注射针头（30 号）装上导管，用持针钳夹住插入大隐静脉。

   解剖显微镜可使进针更为容易。注射时可用棉签轻压以保持针头的位置。注射过程中必须注意腿的活动，否则易穿破血管。
6. 设置 Harvard Apparatus PHD2000 注射泵，使注射液以 8ml/min 的速度注射完毕。保留止血带直至注射完后 2min，之后移除导管和止血带。通过凝胶发泡剂和轻压止血。
7. 用 4-0 号线缝合伤口。
8. 密切观察动物直至麻醉清醒，用热灯可防止动物体热丢失有利于恢复。
9. 术后 2d 每日皮下注射酮洛芬（5mg/kg）。

   也可用醋氨酚［100mg/（kg·d），饮水口服］代替酮洛芬。

# 备选方案 2

# 大鼠的隐静脉内注射

本方案用于大鼠隐静脉内注射，除下列少数步骤外大致于小鼠注射方案一致。

## 附加材料

### 仪器

蝶形输液器（25 号×3/4in 注射针头）

一次性注射器（10ml）

## 方法

1. 将质粒 DNA（50～750$\mu$g，去内毒素）溶于 0.03 倍大鼠体重的无菌、室温生理盐水（如 120g 大鼠注射 3.6ml 液体）。
2. 10ml 注射器吸取注射液，并连于蝶形输液器（25 号翼状输液针头）。
3. 在大隐静脉侧下方斜刺进针。
4. 设置 Harvard Apparatus PHD 2000 注射泵，使注射液以 10nu/min 的速度注射完毕。

### 参考文献


Acsadi G., Jiao S.S., Jani A., Duke D., Williams P., Chong W., and Wolff J.A. 1991. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol.* **3:** 71–81.

Bates M., Zhang G., Sebestyen M.G., Neal Z.C., Wolff J.A., and Herweijer H. 2006. Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *BioTechniques* **40:** 199–208.

Budker V., Zhang G., Knechtle S., and Wolff J.A. 1996. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther.* **3:** 593–598.

Budker V., Zhang G., Danko I., Williams P., and Wolff J. 1998. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* **5:** 272–276.

Chang J., Sigal L.J., Lerro A., and Taylor J. 2001. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences. *J. Virol.* **75:** 3469–3473.

Hagstrom J.E., Hegge J., Zhang G., Noble M., Budker V., Lewis D.L., Herweijer H., and Wolff J.A. 2004. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol. Ther.* **10:** 386–398.

Hengge U.R., Walker P.S., and Vogel J.C. 1996. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J. Clin. Invest.* **97:** 2911–2916.

Herweijer H., Zhang G., Subbotin V.M., Budker V., Williams P., and Wolff J.A. 2001. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene Med.* **3:** 280–291.

Hickman M.A., Malone R.W., Lehmann-Bruinsma K., Sih T.R., Knoell D., Szoka F.C., Walzem R., Carlson D.M., and Powell J.S. 1994. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **5:** 1477–1483.

Hodges B.L. and Scheule R.K. 2003. Hydrodynamic delivery of DNA. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3:** 911–918.

Jiao S., Williams P., Berg R.K., Hodgeman B.A., Liu L., Repetto G., and Wolff J.A. 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum. Gene Ther.* **3:** 21–33.

Kitsis R.N. and Leinwand L.A. 1992. Discordance between gene regulation in vitro and in vivo. *Gene Expr.* **2:** 313–318.

Li K., Welikson R.E., Vikstrom K.L., and Leinwand L.A. 1997. Direct gene transfer into the mouse heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29:** 1499–1504.

Liang K.W., Nishikawa M., Liu F., Sun B., Ye Q., and Huang L. 2004. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther.* **11:** 901–908.

Liu F., Song Y., and Liu D. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6:** 1258–1266.

Maruyama H., Higuchi N., Nishikawa Y., Kameda S., Iino N., Kazama J.J., Takahashi N., Sugawa M., Hanawa H., Tada N., Miyazaki J., and Gejyo F. 2002. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J. Gene Med.* **4:** 333–341.

Miao C.H., Ohashi K., Patijn G.A., Meuse L., Ye X., Thompson A.R., and Kay M.A. 2000. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol. Ther.* **1:** 522–532.

Sikes M.L., O'Malley B.W., Jr., Finegold M.J., and Ledley F.D. 1994. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum. Gene Ther.* **5:** 837–844.

Wolff J.A., Ludtke J.J., Acsadi G., Williams P., and Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1:** 363–369.

Wolff J.A., Malone R., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., and Felgner P. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247:** 1465–1468.

Wooddell C.I., Van Hout C.V., Reppen T., Lewis D.L., and Herweijer H. 2005. Long-term RNA interference from optimized siRNA expression constructs in adult mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334:** 117–127.

Yang J.P. and Huang L. 1996. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther.* **3:** 542–548.

Yang P.L., Althage A., Chung J., and Chisari F.V. 2002. Hydrodynamic injection of viral DNA: A mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 13825–13830.

Zhang G., Budker V., and Wolff J.A. 1999. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10:** 1735–1737.

Zhang G., Budker V., Williams P., Subbotin V., and Wolff J.A. 2001. Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* **12:** 427–438.

Zhang G., Vargo D., Budker V., Armstrong N., Knechtle S., and Wolff J.A. 1997. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum. Gene Ther.* **8:** 1763–1772.

Zhang G., Ludtke J.J., Thioudellet C., Kleinpeter P., Antoniou M., Herweijer H., Braun S., and Wolff J.A. 2004. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **15:** 770–782.

# 第六十九章　用特洛伊木马脂质体进行可穿过血脑屏障的非病毒基因转移

William M. Pardridge

Department of Medicine, University of California, Warren Hall 13-164, Los Angeles, California 90024

赵萌　译



## 摘要

通过静脉注射特洛伊木马脂质体（Trojan horse liposome，THL，也称为 PEGylates 免疫脂质体，PIL）包裹的 DNA，非病毒载体质粒 DNA 可经血管途径穿过血脑屏障传送入脑。100nm 的脂质体表面覆盖着数千个多聚体，如 2000Da 的聚乙二醇（PEG），或称 PEG2000。1%～2%的 PEG 分子末端共价结合了一个靶向性的单克隆抗体（MAb）作为分子特洛伊木马（MTH）。MTH 与血脑屏障和脑细胞膜上的转铁蛋白和胰岛素等受体结合，随后在体内触发受体介导的细胞传递作用使 THL 穿过血脑屏障，与受体介导的穿细胞作用使其进入脑细胞。脑内所转入基因的持续表达时间随着游离脂质体的降解率的升高而降低。THL 技术可在 24h 内实现成体基因转导。例如，一个外源基因可以在一次无需病毒载体的静脉注射后，在 1d 内在脑或其他器官的大多数细胞中广泛表达。THL 的应用有如下几个方面：①由组织特异启动子启动组织特异基因表达；②静脉注射酪氨酸羟化酶基因可使实验性帕金森氏病纹状体酪氨酸羟化酶的水平完全正常化；③用 THL 技术静脉注射反义基因，一周内可 100%增加脑瘤小鼠的存活率；④用静脉注射法进行 RNAi，一周内可 90%增加患颅内脑瘤小鼠的存活率。

## 引言

非病毒载体的基因转导主要利用阳离子聚合物和阴离子 DNA 形成的复合物。这种复合物可以在水中形成小型稳定结构，在生理盐性条件下借助低浓度金属离子聚集成微米大小颗粒（Plank et al. 1999；Simberg et al. 2003）。这种聚集在培养的细胞中可很好

地起作用，而在动物静脉注射后效率较低。这些微粒通过培养细胞的吞噬作用被吸收，使转基因在培养组织中表达（Matsui et al. 1997；Niidome et al. 1997）。但在体内，静脉注射后聚集物很快就聚集到血管床处，参与肺部循环。它们栓塞了肺部毛细血管，所以与外周组织相比，肺部基因的表达呈对数级增加（Hong et al. 1997；Song et al. 1997）。静脉注射的阳离子复合物不能使基因在脑部表达。

THL与阳离子脂质体在分子设计方面有显著的不同。阳离子脂质体和带阴离子的DNA分子形成三明治结构，这样DNA分子就暴露在周边核酸酶的环境下（Simberg et al. 2001）。而在THL中，单个的超螺旋质粒DNA都被包裹在100nm脂质体的内部，脂质体上有少量带正电的脂质，但是总体所带电荷为负（Pardridge 2003）。这种包被结构使质粒DNA可耐受体内环境中存在的内切核酸酶和外切核酸酶（Shi and Pardridge 2000）。

质粒DNA在设计的时候必须包含合适的启动子和3′非翻译区（UTR）。在用阳离子脂质体转染培养细胞时某些启动子可以启动转入基因的表达。阳离子复合物的治疗指数很窄，这对细胞是有害的。而且它可能激活转录通路，所以弱启动子可以使所转入基因在培养细胞中表达（Kofler et al. 1998）。但这样的启动子可能不能在体内启动用THL转入的基因表达。而且，3′UTR可能包含一个抑制翻译的序列，导致转入体内的基因无法表达（Luikenhuis et al. 2004）。

由于网状内皮组织会迅速吸收血清中的蛋白质，体内存在的脂质体会由于其表面蛋白质被迅速清除。但是，在脂质体表面共价偶联的数千个如PEG2000的复合物会将这种吸收作用降到最低程度（Papahadiopoulos et al. 1991）。在体内，一个包裹DNA的PEGylated脂质体只能使很少量的基因穿过细胞膜。PEGylated脂质体很少有机会通过细胞膜内化作用或肝脾中的细胞摄取作用入膜。在PEGylated脂质体1%～2%的多聚链末端共价结合受体特异的MTH即成为THL（图1A）。MTH结合细胞膜受体触发细胞内化。内化的程度取决于受体的特异性。在体内用IgG同型抗体取代THL的受体特异靶向位点MAb时，检测不到基因的表达（Shi et al. 2001）。图1B为THL的电子显微镜照片。此次实验将THL与共价连接有10nm金颗粒的抗鼠抗体混合。10nm金颗粒与MAb的大小相当，它的位置显示了MAb和脂质体表面的关系；PEG2000分子在脂质体与MAb之间起桥梁作用。

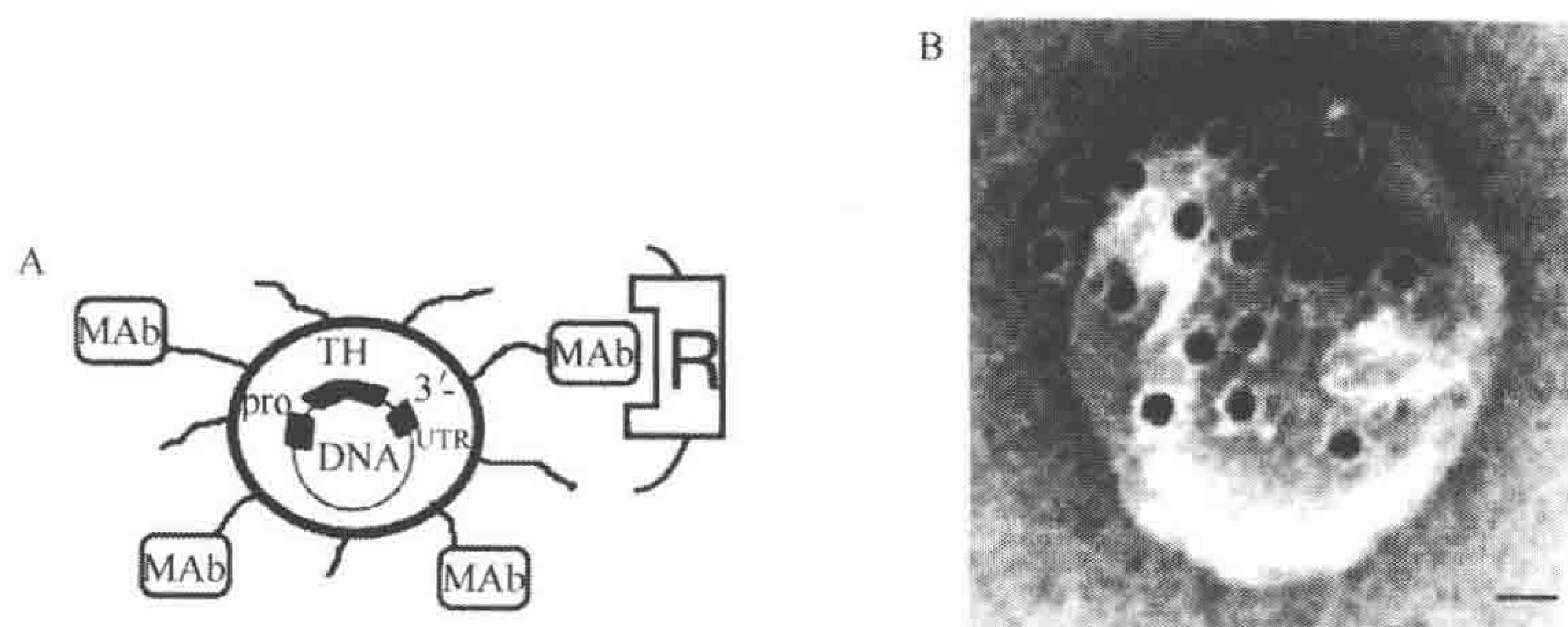



图1. A. 包被超螺旋表达质粒DNA的85nm PEGylated免疫脂质体通过受体特异的胞内单克隆抗体（MAb）靶向细胞膜受体（R）的示意图。质粒的组织特异表达由在5′端插入的启动子（pro）调控。TH代表酪氨酸羟化酶。B. PIL的电子转移显微镜图。与2000Da的聚乙二醇（PEG）相连的MAb分子共价结合了一个10nm的金颗粒和二抗。金颗粒的位置显示了PEG连接的MAb和脂质体的关系。放大倍率20nm（经许可从Zhang et al. 2003b获得）。

在成体大鼠、小鼠及恒河猴体内转运质粒 DNA 的受体特异性 MAb 是种属特异的（Pardridge 2001）。用大鼠 8D3 MAb 进行以在大鼠中无活性的小鼠转铁蛋白为受体的小鼠的基因转运，而以小鼠转运蛋白为受体的小鼠体内的基因转运要用鼠 OX26 MAb。这些抗体在类人猿或人类体内没有活性。在旧大陆类人猿体内的基因转运要用 83-14 鼠 MAb 和人胰岛素受体（HIR），其不可用于新大陆类人猿。能引起免疫反应的 MAb 不能在人体中应用，但是一种与其活性相当的经过基因改造的类型可以用于人体。一次 THL 注射要用到 1～3mg 纯化的 MAb，所以必须获得能在腹水或者大量无血清培养液中分泌足量 MAb 的杂交瘤细胞。MAb 与受体结合比 BBB 转铁蛋白与胰岛素受体的结合更容易被应用，但是这一点还没有得到证实。由于并非所有 MAb 受体在与膜结合后启动内吞，所以结合受体的 MAb 必须是内吞抗体。

## 报道基因在脑中的组织特异性表达

不管是通过病毒还是非病毒方式，THL 是迄今唯一能够在一次静脉注射后使转基因在脑中表达的实验方法。图 2（见彩版）显示了其在大鼠、小鼠及恒河猴中的应用情

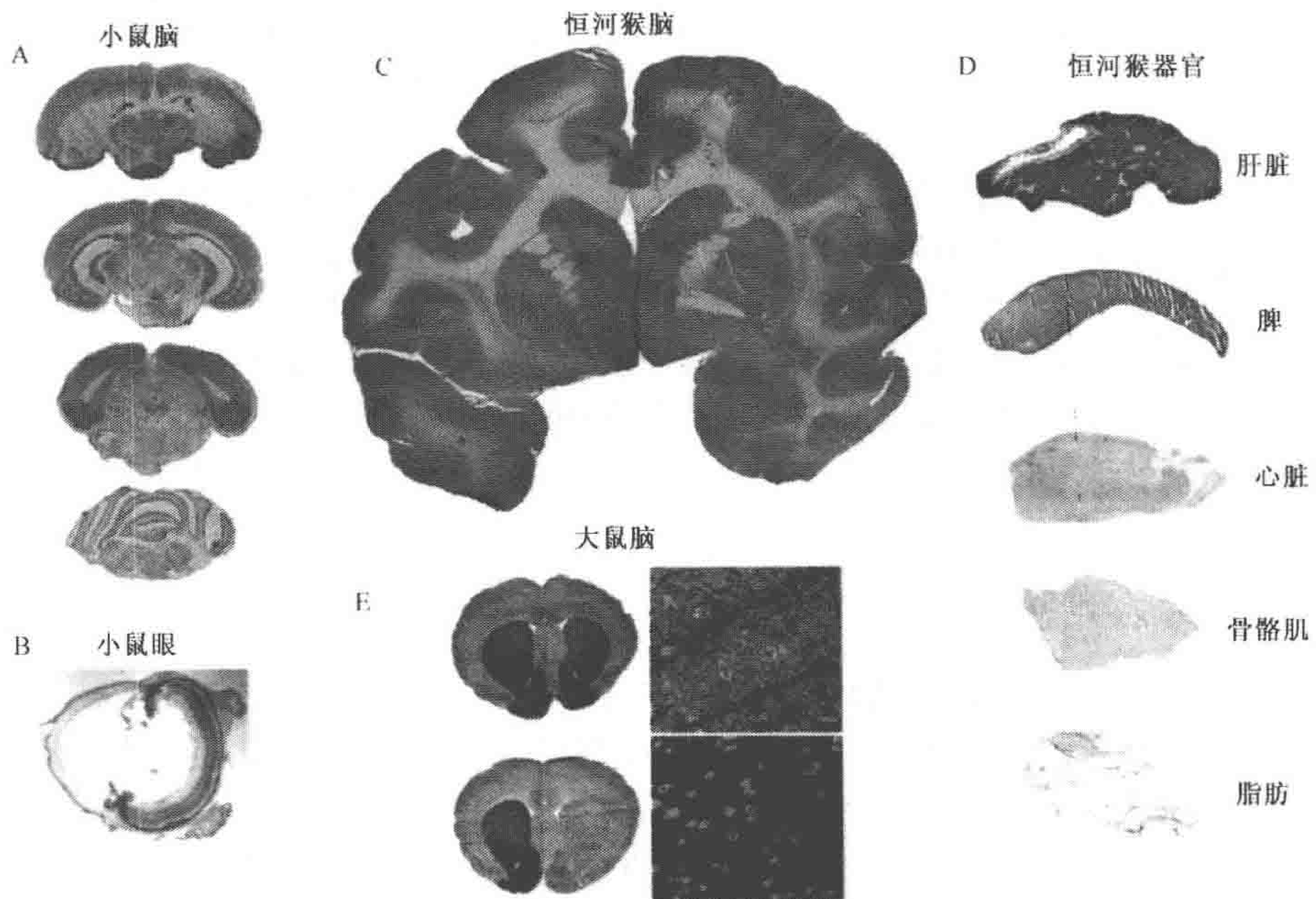



图 2.（A，B）向成体小鼠静脉注射连接 8D3 大鼠 MAb 靶向小鼠转铁蛋白的包被 β-半乳糖表达质粒的 PIL 48h 后，脑（A）和眼（B）β-半乳糖组化图。（C，D）向成体恒河猴静脉注射连接83-14 鼠 MAb 靶向 HIR 的包被 β-半乳糖表达质粒的 PIL 48h 后，脑（C）和外围器官（D）β-半乳糖组化图。在心脏，骨骼肌或脂肪中没有基因的表达。（E）向大鼠静脉注射连接 OX26 小鼠 MAb 靶向大鼠转铁蛋白受体（顶栏）或小鼠 IgG2a 同型抗体（底栏）的包被酪氨酸羟化酶表达质粒的 PIL 72h 后切除脑部，酪氨酸羟化酶免疫组化（左栏）和共聚焦显微镜图（右栏）。在基因转移前三周，向大鼠的右侧中前脑纤维束注射 6-羟多巴胺，导致同侧纹状体对神经毒素损伤的酪氨酸羟化酶免疫反应完全丧失。结合转铁蛋白受体 MAb 的 PIl 的基因治疗可使纹状体酪氨酸羟化酶水平完全正常化（顶栏）。如果包被酪氨酸羟化酶表达质粒的 PIL 与不靶向 BBB 受体的同型抗体连接（底栏）则没有纹状体酪氨酸羟化酶的重塑。在 A、C 或 D 中都没有复染色（A，经许可从 Zhu et al. 2004 获得；B，经许可从 Zhu et al. 2002［©在 Vision and Ophthalmology 联合研究］获得；C 和 D，经许可从 Zhang et al. 2003a［© Elsevier］获得；E，经许可从 Zhang et al. 2004a 获得）。

况。向成体大鼠体内静脉注结合 8D3 MAb 的包裹 β-半乳糖苷酶表达质粒的 MAb；48h 后，切除脑并在冰冻环境下进行 β-半乳糖苷酶的组化检测。如图 2A 所示，转入基因可在包括脑干在内的全脑（Zhu et al. 2004）以及所有视网膜色素上皮细胞中表达，但在感光细胞中没有表达（图 2B）。在感光接受层中没有检测到基因表达，因为在感光细胞核外层只有很少量的转铁蛋白受体（Zhu et al. 2002）。胰岛素受体在核外层表达，当转基因结合 HIR MAb 时，可以观察到基因在感光细胞中的表达（Zhang et al. 2003c）。

向成体恒河猴体内静脉注射结合 83-14 MAb 的包裹 β-半乳糖苷酶表达质粒的 MAb (Zhang et al. 2003a)，48h 后，可观察到转入基因在全脑中（图 2C）和大部分肝和脾中表达，但是在心脏、骨骼肌或脂肪中没有表达（图 2D）。THL 在入核之前必须穿越两道屏障：第一道屏障是血管内皮细胞（脑中的 BBB），第二道屏障是所靶向器官中实质细胞的质膜。脑和眼中的胰岛素受体存在于屏障 1 和 2 中，但是在心脏、骨骼肌和脂肪中只存在于屏障 2 上，这就解释了所转入基因的器官分布。胰岛素受体表达在肝或脾的屏障 1 中，但是 THL 在这些器官中可以自由地穿过被窦状毛细血管床灌注的多孔动脉膜。而心脏、骨骼肌和脂肪被一个具有连续内皮细胞屏障的毛细血管床灌注。要想使 THL 应用在外周组织中，必须发现一种可以穿越这些组织中血管内皮屏障的新型 MAb。

由于转铁蛋白或者胰岛素受体在其他器官中也有表达，用靶向脑 BBB 转铁蛋白或胰岛素受体的 THL 进行转导的基因会在外周组织中有异常表达。但是，如果携带转基因的表达质粒连接有如胶质纤维酸性蛋白（GFAP）基因 5′端序列的脑特异性启动子，在小鼠中的异常表达可被清除（Shi et al. 2001）。与之相似的是，在成体恒河猴体内，静脉注射携带有视网膜色素基因 5′端序列启动子的基因的 THL 时，在脑或外周组织中没有观察到转基因的表达，但是在眼部有表达（Zhang et al. 2003c）。组织特异性基因启动子与 THL 结合可使转基因具有很高的靶向性。

## THL 的静脉基因注射疗法

一个携带有能编码靶向人内皮生长因子受体（EGFR）700 核苷酸的反义 RNA 表达质粒的 THL 被构建（Zhang et al. 2002a），连续一周向有颅内人脑瘤的小鼠体内静脉注射这种连接有两个 MAb 的 THL。大鼠 8D3 MAb 与小鼠转铁蛋白受体结合使 THL 穿过小鼠脑瘤的 BBB，鼠 83-14 MAb 与 HIR 结合使 THL 穿过脑瘤细胞的质膜。静脉注射 THL 一周可以 100%的延长存活时间（Zhang et al. 2002a）。

包裹有编码通过 RNAi 敲除 EGFR 的短发夹 RNA（shRNA）的表达质粒，连接有 8D3 和 83-14 MAb 的 THL 也被用于颅内脑瘤小鼠，一周的静脉注射后，RNAi 基因疗法可达 90%的延长携带人颅内脑瘤的成体亚急性联合免疫缺陷小鼠（SCID）的存活时间。这个结果首次证明了静脉 RNAi 基因疗法可以延长携带试验性肿瘤的动物的存活时间。

如图 2E 所示（顶端条带），在有实验性帕金森氏病的成体大鼠体内，携带酪氨酸羟化酶表达质粒的 THL 可以使条纹酪氨酸羟化酶的表达 100%正常化。如图 2E 所示（底部条带），如果携带酪氨酸羟化酶表达质粒的 THL 连接的是小鼠 IgG2a 同型物，则

条纹酪氨酸羟化酶不会重新生成（Zhang et al. 2004a）。

THL可运送包含反向末端重复序列的质粒，对目的基因组进行永久的随机整合。但是，对目的基因组的随机整合所造成的插入突变使之在实际应用中不太可行。用据有附加功能的质粒DNA可进行可逆的基因治疗，与其他药物相似，可重复阶段给药。

# 方案

## THL的准备

这个方案介绍了可用于体内和体外基因转移的PEGylaed免疫脂质体，即THL的准备方法。

### 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法请见附录。

#### 试剂

[α-$^{32}$P] dNTP＜!＞用于缺口平移

氯仿＜!＞

EDTA

Ellman试剂＜!＞（5，5′-二硫代二硝基苯甲酸，DTNB）

HEPES（0.05mol/L，pH 7.0）

脂质（如Avanti Polar Lipids）

- DDAB(溴化二甲基二八癸胺)＜!＞(631Da)
- DSPE-PEG2000＜!＞（二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-PEG2000）（2748Da）
- DSPE-PEG2000-马来酰亚胺＜!＞（2955Da）
- POPC（1-棕榈酰-2-油酰-*sn*-甘油酰-3-胆碱磷酸）（760Da）

液氮或干冰/乙醇浴＜!＞

氮气

NSP(3H-N-琥珀酰亚胺丙酸酯＜!＞)或[$^{125}$I]碘＜!＞和氯胺T＜!＞或四氯二苯基苷脲＜!＞

胰腺内切核酸酶I＜!＞和外切核酸酶III＜!＞

质粒DNA

大量制备质粒DNA一般以200μg质粒DNA开始。

受体特异MAb（详细信息见前言）

Sepharose CL-4B柱（1.5cm×20cm）

硼酸钠缓冲液（0.15mol/L，pH8.5）/EDTA（0.1mmol/L）

三氯乙酸（TCA）＜!＞

## 仪器

超声波清洗仪

手动挤压机（如 liposofast 手动挤压机，Avestin）和聚碳酸酯滤器，孔径为 400nm 和 100nm 各两个（也可能需要 50nm；见步骤 4）

凝胶过滤层析装置

玻璃管（12mm×75mm）

Millipore Millex-GV 滤器（0.22μm）

激光力度分析仪

调速摇床

旋转蒸发仪（可选，见步骤 4）

闪烁计数仪

分光光度计

涡旋器

## 方法

1. 放射标记 MAb。

   通过确定连接到 THL 上的 MAb 的分子数来作为每批 THL 质控指标的一部分。

   a. 用 NSP 标记 MAb 上赖氨酸残基上的 ε-氨基

   也可用 [$^{125}$I] 碘和氯胺 T 或四氯二苯基苷脲进行放射标记。在一个月之后丢弃$^{125}$I 标记的 MAb，$^{3}$H 标记的 MAb 可在－20℃储存 6～12 个月。

   b. 在每次生成 THL 反应之前测定放射标记的 MAb 的 TCA 沉淀率。

   c. 用凝胶过滤层析纯化 TCA 沉淀率小于 95%的 MAb。

2. 以切口平移法用$^{32}$P 放射标记质粒 DNA 的一部分，测量被包裹在 THL 内部的 DNA 的量，作为每批 THL 的质控指标。在 4℃储存 10d 后，丢弃$^{32}$P 标记的质粒。

3. 将 MAb 的巯基与 DSPE-PEG2000-马来酰亚胺的马来酰亚胺基连接形成稳定的硫醚键。用如下方法硫醇化 MAb：

   a. 在一个 12mm×75mm 玻璃管中准备如下溶液：

   3.0mg MAb（20nmol）

   2μCi $^{3}$H 标记 MAb

   约 200μl 0.15mol/L 硼酸钠缓冲液(pH8.5)/EDTA（0.1mmol/L）

   b. 加入 1200nmol Traut 试剂。

   当靶向 MAb 为小鼠 IgG2a 同型物时（如 OX26 或 83-14MAb），其与 MAb 之间的摩尔比为 60∶1，当靶向 MAb 为大鼠 IgG（如 8D3 MAb）时，用 40∶1 作为摩尔比。目的是为了在每个 MAb 上多添加 1～1.5 个巯基。

   c. 用 Ellman 试剂和分光光度计法确定巯基的数目。

   如果每个 MAb 上的巯基的数目大于 1.5，可能发生了 MAb 分子内交联。如果每个 MAb 上的巯基的数目小于 1.0，MAb 与脂质体的结合效率将会降低。

4. 脂质体的生成和析出步骤如下：

a. 在加入 1ml 氯仿的 12mm×75mm 玻璃管中准备如下溶液：

18.6μmol POPC

0.6μmol DDAB

0.6μmol DSPE-PEG 2000

0.2μmol DSPE-PEG 2000-马来亚酰胺

b. 在氮气流下完全蒸发溶液，同时持续涡旋以产生薄液膜层。

也可用旋转蒸发仪代替。小心生成薄液膜层。

c. 加入 300μl 0.05mol/L HEPES（pH7.0）水化脂质，使之大约为 100mmol/L。

水化和随后的涡旋要小心处理没有中断。

d. 将水化的脂质在超声波清洗仪中放置 2min，最大速度涡旋 1min。用激光力度分析仪以动态散射颗粒测量技术确定脂质体的直径。

在水化、涡旋和超声处理后，脂质体的大小应该是 500～1000nm。在处理过程中随时监控脂质体的大小。

e. 在水化的脂质中加入质粒 DNA（100～250μg）和大约 1μCi 的 32P 标记的质粒 DNA。

f. 在液氮或者干冰或乙醇浴中冰冻混合物 5min，37℃溶解脂质 10min。重复这个循环 5～7 次。

质粒 DNA 在重复的冻融过程中被包裹在大的脂质体中。如果样品中有过量的气泡则会干扰下一步的析出过程，应该被除去。

g. 加入 HEPES 缓冲液（0.05mol/L，pH7.0），使脂质终体积大约为 500μl 或 40mmol/L。

h. 为了降低脂质体的大小，在手动挤压机上用两层叠加的 400nm 孔径的聚碳酸酯滤膜过滤脂质/DNA 混合物。重复 5 次。将两层叠加的 100nm 孔径的聚碳酸酯滤膜放入挤压机中，过滤脂质/DNA 混合物 5 次。

此时脂质体的最佳直径应该是 80～120nm，达到这个直径可能需要将混合物过双层孔径为 50nm 的滤膜。

5. 按如下步骤进行核酸酶降解：

a. 向脂质体中加入胰腺内切核酸酶 I 和外切核酸酶 III，37℃孵育 60min。

如果析出过程操作正确会有 40%～60%的 DNA 包裹在 100nm 的脂质体中，但仍有残存。这些未被包裹的 DNA 在体内有毒性必须被去除。正因为如此需要核酸酶的作用（Monnard et al. 1997）。

b. 加入终浓度为 20mmol/L 的 EDTA 终止反应。

不推荐用强阴离子交换柱如 DEAE 去除外部 DNA，因为它不能去除静电贴附在脂质体表面带正电脂质残基上的阴离子 DNA。用 DEAE 柱进行的 THL 纯化会含有大量的未被包裹的 DNA，从而导致体内毒性和炎症反应（Norman et al. 2000）。

6. 连接和凝胶过滤层析过夜：

a. 把核酸酶处理的 PEGylated 脂质体和硫醇化的 MAb 混合。

b. 封闭溶液，加入氮气，室温下轻微振荡过夜。

c. 将预备液加入用 0.05mol/L HEPES（pH7.0）平衡的 1.5cm×20cm 的 Sepharose CL-4B 柱。在室温下用 HEPES 缓冲液以 1ml/min 的速度洗柱，收集 1ml 片段（Huwyler et al. 1996）。

d. 数出每个片段的 $^{3}H$ 和 $^{32}P$ 的放射活性。$^{3}H/^{32}P$ 双同位素闪烁计数，$^{3}H$ 在 0-16keV 窗口计数，$^{32}P$ 在 16～1700keV 窗口计数。

e. 用 CL-4B 柱的第一个或脂质体峰的 $^{32}P$ 的放射活性来确定被包裹 DNA 的百分数。

f. 用同一个峰 $^{3}H$ 的放射活性来计算单个 THL 结合 MAb 分子的数目。

THL 在片段 10，大约 10ml 洗脱体积时候出峰。未共价结合的 MAb 洗脱体积大约在 25ml，核酸酶降解的核苷酸在 30～35ml 处洗脱。在 $^{32}P$ 通道里没有 $^{3}H$ 的溢出，但是在 $^{3}H$ 通道里大概有 2%的 $^{32}P$ 溢出。在计算 $^{3}H$ 和 $^{32}P$ 的放射活性时溢出应该被考虑在内。

7. 在使用 THL 之前，用 0.22μm 的 Millipore Millex-GV 滤膜过滤除菌，这样不会改变其结构整体性（Zhang et al. 2002b）。在 THL 生成后 24h 内用于培养的细胞或注射入动物体内，如果在 CL-4B 柱洗脱的同一天内应用更佳。THL 可在 4℃储存过夜。

## 致谢

本工作得到了 U. S. Department of Defense 一项基金及 NIH 基金 R01-NS-53540 的支持。

## 参考文献

Hong K., Zheng W., Baker A., and Papahadjopoulos D. 1997. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* **400:** 233–237.

Huwyler J., Wu D., and Pardridge W.M. 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 14164–14169.

Kofler P., Wiesenhofer B., Rehrl C., Baier G., Stockhammer G., and Humpel C. 1998. Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo. *Cell Transplant.* **7:** 175–185.

Luikenhuis S., Giacometti E., Beard C.F., and Jaenisch R. 2004. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 6033–6038.

Matsui H., Johnson L.G., Randell S.H., and Boucher R.C. 1997. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **272:** 1117–1126.

Monnard P.A., Oberholzer T., and Luisi P. 1997. Entrapment of nucleic acids in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1329:** 39–50.

Niidome T., Ohmori N., Ichinose A., Wada A., Mihara H., Hirayama T., and Aoyagi H. 1997. Binding of cationic α-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J. Biol. Chem.* **272:** 15307–15312.

Norman J., Denham W., Denham D., Yang J., Carter G., Abouhamze A., Tannahill C.L., MacKay S.L.D., and Moldawer L.L. 2000. Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation. *Gene Ther.* **7:** 1425–1430.

Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S.K., Lee K.D., Woodle M.C., Lasic D.D., Redemann C., and Martin F.J. 1991. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 11460–11464.

Pardridge W.M. 2001. *Brain drug targeting: The future of brain drug delivery.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

———. 2003. Gene targeting in vivo with pegylated immunoliposomes. *Methods Enzymol.* **373:** 507–528.

Plank C., Tang M.X., Wolfe A.R., and Szoka F.C., Jr. 1999. Branched cationic peptides for gene delivery: Role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum. Gene Ther.* **10:** 319–332.

Simberg D., Weisman S., Talmon Y., Faerman A., Shoshani T., and Barenholz Y. 2003. The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *J. Biol. Chem.* **278:** 39858–39865.

Simberg D., Danino D., Talmon Y., Minsky A., Ferrari M.E., Wheeler C.J., and Barenholz Y. 2001. Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. *J. Biol. Chem.* **276:** 47453–47459.

Shi N. and Pardridge W.M. 2000. Non-invasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 7567–7572.

Shi N., Zhang Y., Boado R.J., Zhu C., and Pardridge W.M. 2001. Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 12754–12759.

Song Y.K., Liu F., Chu S., and Liu D. 1997. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum. Gene Ther.* **8:** 1585–1594.

Zhang Y., Schlachetzki F., and Pardridge W.M. 2003a. Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol Ther.* **7:** 11–18.

Zhang Y., Zhu C., and Pardridge W.M. 2002a. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther.* **6:** 67–72.

Zhang Y., Lee, H.J., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2002b. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J. Gene Med.* **4:** 183–194.

Zhang Y., Calon F., Zhu C., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2003b. Intravenous non-viral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental Parkinsonism. *Hum. Gene Ther.* **14:** 1–12.

Zhang Y., Schlachetzki F., Li J.Y., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2003c. Organ-specific gene expression in the Rhesus monkey eye following intravenous non-viral gene transfer. *Mol. Vis.* **9:** 465–472.

Zhang Y., Schlachetzki F., Zhang Y.F., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2004a. Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental Parkinsonism with intravenous non-viral gene therapy and a brain-specific promoter. *Hum. Gene Ther.* **15:** 339–350.

Zhang Y., Bryant J., Zhang Y.F., Charles A., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2004b. Intravenous RNAi gene therapy targeting the human EGF receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* **10:** 3667–3677.

Zhu C., Zhang Y, and Pardridge W.M. 2002. Widespread expression of an exogenous gene in the eye after intravenous administration. *Invest. Opthalmol. Vis. Sci.* **43:** 3075–3080.

Zhu C., Zhang Y., Zhang Y.F., Li J.Y., Boado R.J., and Pardridge W.M. 2004. Organ specific expression of lacZ gene controlled by the opsin promoter after intravenous gene administration in adult mice. *J. Gene Med.* **6:** 906–912.

# 第七十章　声穿孔：一种将基因导入鸡胚的有效技术

Sho Ohta*, Ogino Yukiko*, Kentro Suzuki*, Mika Kamimura*, Katsuro Tachibana† 和 Gen Yamada*

* Center for Animal Resources and Development (CARD) and Graduate Schol of Medical and Pharmaceutical Sciecces, Kumamoto University, Honjo 2-21, Kumamoto 860-0811, Japan; † Department of Anatomy, Fukuoka University School of Medicine, 7-45-1 Nankuma, Jonan-ku Fukuoka 814-0180, Japan

金海霞　译



## 摘要

声孔效应是一种将基因导入组织如鸡胚组织的新方法。通过暴露于超声，继而微气泡破裂的联合作用，声孔效应能够增强基因整合入靶组织。声孔效应有以下几个优点：①操作简单，包括两个主要步骤——制备微气泡-DNA 混合物，接着注射并超声处理靶组织；②基因能高效整合入间质组织；③不引起明显的组织损伤——大多数声孔效应后的鸡胚能够存活，并且没有显著的胚胎异常或者细胞死亡；④可以将基因导入多种鸡胚组织（如鳃弓和侧板中胚层）。为了证明声孔效应的作用，将带有 sonic hedgehog (*shh*) 基因的表达载体整合入发育中的鸡肢芽，引起 *shh* 表达胚胎形成额外的趾。声孔效应可能不适用于将基因导入带有腔形成结构或开放性结构的组织中。对神经管和肢外胚层的声孔效应经常引起弥散性基因表达，这是由于注射的微气泡在超声处理前发生扩散。除了这些问题，声孔效应是在体内分析基因功能的一种有效方法，并给医学、分子生物学和发育生物学的基因转移带来一片新的领域。

## 引言

基因转移对分析脊椎动物胚胎发生中的基因功能非常有用（Yamada et al. 1997; Ohta et al. 2003）。反转录病毒或腺病毒介导的基因转移方法能有效增强转基因的操作

(Morgan and Fekete 1996)。但是，这些方法在基因表达的时间和空间调控上存在某些问题。电转化已经发展成以调控方式导入基因（Nakamura and Funahashi 2001)。该技术存在一些缺点，包括组织损伤。为了防止这些问题的发生，我们为发育中的胚胎发展了一种新的基因转移技术，称为声孔效应，这是基于完全不同的原理。

声孔效应是一种联合利用微气泡和超声的有效基因整合方法。最初，它是在基因治疗等领域作为一种给药系统得以发展的（Tachibana and Tachibana 1995，2001)。现在，它已经用于多种鸡胚组织（表 1)。这里，我们给出了声孔效应用于胚胎鸡器官的步骤（肢芽的例子在 Hamburger 和 Hamilton [HH] 20～21 阶段中给出）（图 1)。该步骤包括制备 DNA-微气泡混合物、注射入靶组织以及暴露于超声。超声的 3 个参数非常重要：强度（$W/cm^2$)；工作期（%)，这给出的是脉冲照射的频率；以及暴露时间（s)。在我们的实验中，设置为 2.0$W/cm^2$，工作期 20%和 60s 能够使基因高效整合入鸡肢芽间质细胞。为了证明声孔效应的作用，将带有 *shh* 基因的表达载体导入发育中的鸡肢芽。在该 shh 表达胚胎中观察到形成额外的趾（图 2C～E，见彩版)。基因也能通过声孔效应导入鼠胚胎外植体和一些成年鼠器官（S. Ohta，未发表的数据)。

**表 1. 通过声孔效应将基因导入多种鸡组织的参数**

| 注射位点和阶段（HH 阶段） | DNA 溶液/μl：微气泡/μl | 超声照射时间/s |
|---|---|---|
| 鳃弓（HH 20～21 阶段） | 20：10 | 60 |
| 侧板中胚层（HH 15～16 阶段） | 20：20 | 60 |
| 神经管（HH 10～11 阶段） | 20：20 | 10 |

该表对基因转移入多种鸡组织的参数进行了总结。导入鳃弓、侧板中胚层和神经管的基因给予超声强度 2.0$W/cm^2$，工作期 20%。DNA 溶液的浓度为 1.0～2.0μg/μl。

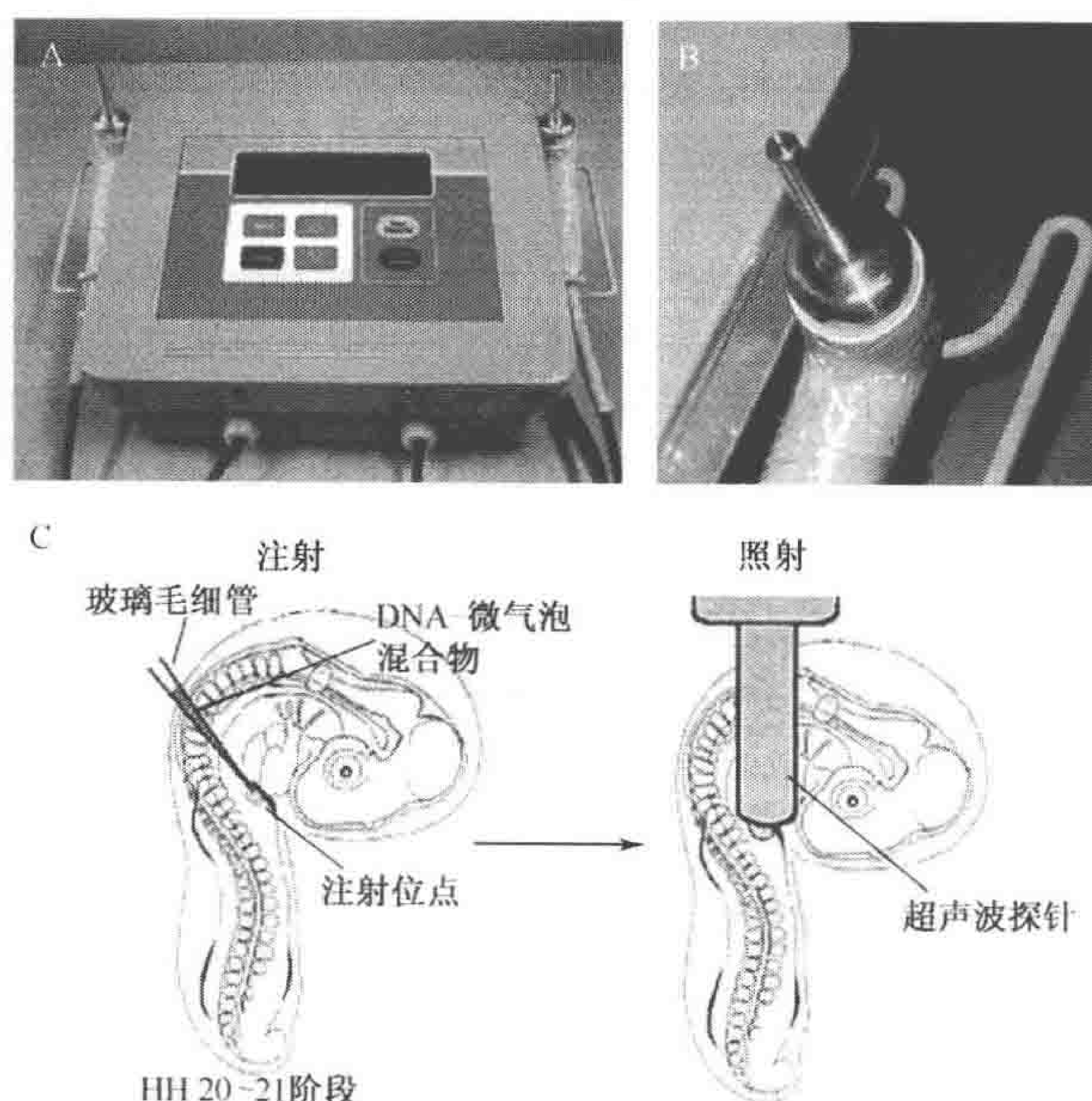



图 1. A. Sonitron 2000N；B. 超声波探针；C. 在 HH 20～21 阶段，将 DNA-微气泡混合物注射入鸡肢芽。为了达到有效的基因转移，需要将 DNA-微气泡混合物维持在靶组织。注射后，立即用 3mm 直径的超声波探针进行超声照射。

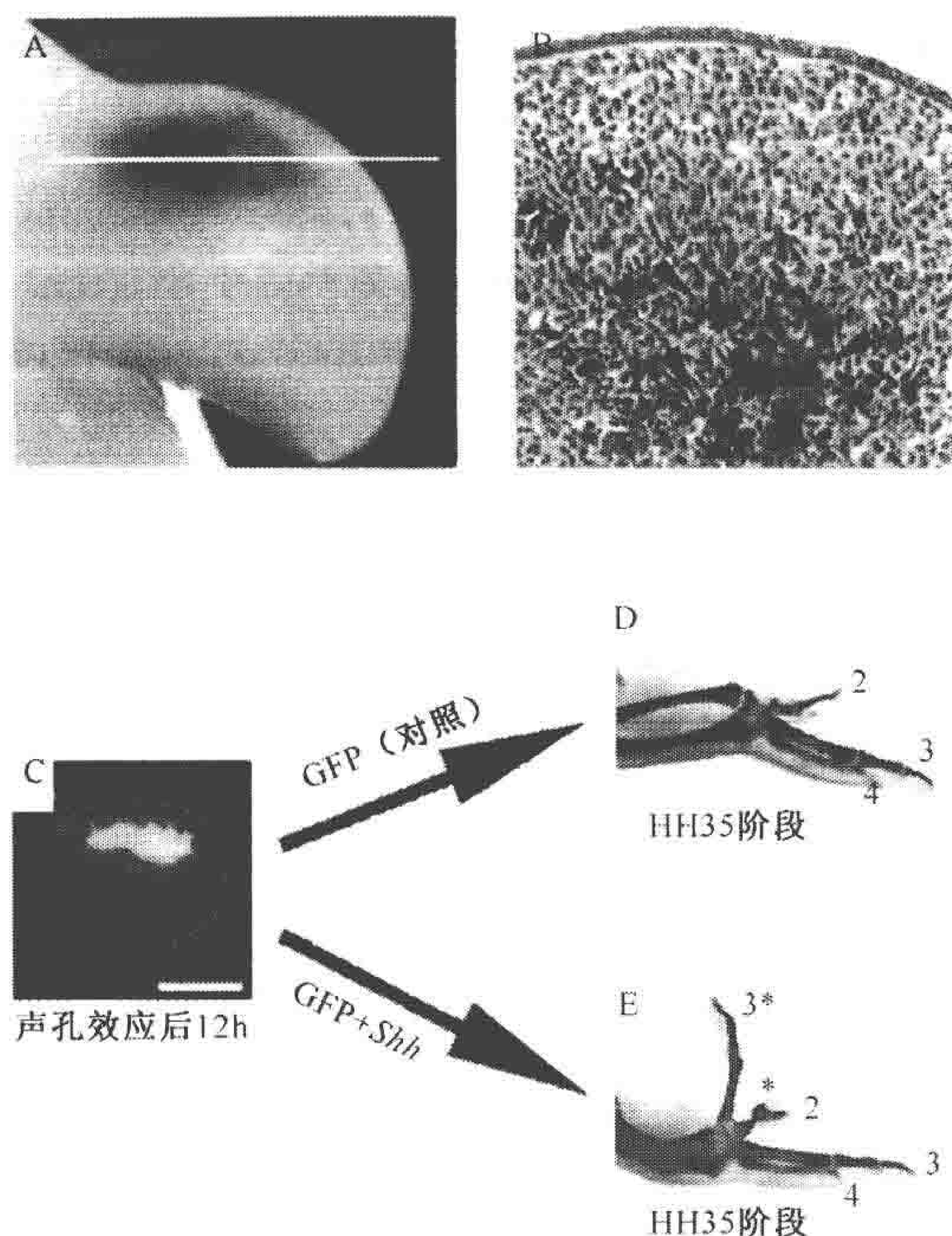



图 2. A. 通过声孔效应，将 LacZ 表达载体导入鸡肢芽。12h 后，在前肢芽部位检测 LacZ 的表达。B. 在表达载体处理过的肢芽横切面上，在肢芽间质中检测导 LacZ 阳性的细胞。C～E. *Shh* 在前肢芽的异位表达导致额外趾的形成。为了观察声孔效应后的基因表达区域，同时将 pCAGGS-*cShh* 和 pCAGGS-GFP 导入前肢芽部位。12h 后，在前肢芽部位检测 GFP（绿色荧光蛋白）的表达。在 *Shh* 异位表达的胚胎中观察到额外趾的形成。

声孔效应可能不适用于将组织导入带有腔形成结构或开放性结构的组织中，在这些组织中，微气泡的扩散可能导致弥散性基因表达。利用更高浓度的 DNA 或者用黏稠的溶剂混合 DNA，增加 DNA-微气泡混合物的黏性，可能对防止注射入混合物的扩散有一定帮助。目前已经发展了一些新的带正电荷的微气泡。利用更小更好的超声发射探针，直径为 0.5mm 而不是 3mm，可能增加限制性胚胎基因转移。虽然存在一些缺点，但声孔效应已在多种组织中达到了有效的基因整合而且不引起显著的组织损伤（Ohta et al. 2003）。

## 方案

## 利用声孔效应将基因转移入胚胎

该方案首先描述了如何利用声孔效应将载体导入胚胎鸡肢芽。

## 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

### 试剂

乙醇（70%）

表达载体，如 pEGFP（Clontech；632319），其 DNA 浓度为 1.0～2.0μg/μl

将 DNA 溶解在 TE 溶液（pH8.0）。

鸡受精卵

Hank 溶液（10mmol/L HEPES，140mmol/L NaCl，27mmol/L KCl＜!＞，0.1%葡萄糖，0.34mmol/L $Na_2HPO_4$＜!＞，0.5mmol/L $CaCl_2$＜!＞，0.5mmol/L $MgCl_2$＜!＞，pH 为 7.4）

OPTISON：微气泡试剂（Amersham Health 2707-03）

2～8℃冷藏。

氯化钠（NaCl；0.9%）或者磷酸盐缓冲液（PBS）

TE 溶液（10mmol/L Tris-HCl＜!＞，1mmol/L EDTA，pH 为 8.0）

### 仪器

黑墨水（Pelikan）

镊子（watchmaker 的 5 号直镊子）

从玻璃毛细管制备得到的玻璃显微针（G-1；Narishige）

预先设定微 38.5℃的孵箱

微量移液器

显微镜

培养皿（35mm）

剪刀（直、精制）

Sonitron 1000N 或者 Sonitron 2000N（RichMae，Inola，Oklahoma 或者日本的 Nepagene）

用于从蛋清中吸取受精卵的注射器（5ml）和 18 计量注射针

用于注射墨水的注射器（1ml）和 26 计量注射针

0.5ml 的管

乙烯树脂带

## 方法

### 制备 DNA-微气泡混合物

1. 取 5～10μl DNA 储存液（如 pEGFP 1.0～2.0μg/μl）置于 0.5ml 管中。
2. 在管中加入 10～15μl 0.9%的 NaCl 或者 PBS（DNA 终浓度为 0.25～1.0μg/μl）。

3. 轻轻摇晃 OPTISON，直到溶液均匀。在含有 DNA 的管中加入 10～20μl 微气泡溶液。混合均匀并放在冰上。

   该 DNA-微气泡混合物可用于注射 10 次。在制备后 2h 内使用。

### 声孔效应

举例，用于 HH20～21 阶段鸡肢芽的基因转移。

4. 在 38.5℃孵育鸡受精卵，直至 HH 20～21 阶段。
5. 用 70%乙醇对卵壳进行消毒。在卵的圆头端制造一个小孔。吸取 4～5ml 蛋清到装有 18 计量注射针的 5ml 注射器中。
6. 用精制的直剪去除卵壳，从而为后面的操作打开一个窗口。
7. 用 Hank 溶液约 10 倍稀释黑墨水。为了观察鸡胚，用装有 26 计量注射针的 1ml 注射器在囊胚层中注射 0.05～0.1ml 稀释的黑墨水。
8. 用精制的 watchmaker 镊子去除鸡肢芽邻近的卵黄膜。如果需要，用几滴 Hank 溶液。
9. 用微量移液器均匀混合 DNA-微气泡混合液。在 35mm 培养板上滴上 2～3μl DNA-微气泡混合液。将 0.25～0.5μl DNA-微气泡混合液吸入玻璃显微针中。保证微气泡在 DNA-微气泡混合液中。
10. 将 DNA-微气泡混合液注射入肢芽间质（图 1C）。由于 DNA-微气泡混合液会从注射位点渗漏出去，可以根据靶器官调整注射方法。注射后，通过在亮视野显微镜下观察到白色（反射光引起的白色）确保注射部位存在微气泡。
11. 将超声波仪的探针（3mm 直径）轻轻地接触注射区域使注射的肢芽部位暴露于超声。所用参数为 2.0W/cm$^2$ 工作期 20%，以及 60s（图 1A，B）。超声照射后，注射部位的白色消失。
12. 超声暴露后，用乙烯树脂带覆盖窗口并孵育受精卵。
13. 用 LacZ（图 2A，B）或者绿色荧光蛋白（GFP）（图 2C～E）来观察鸡胚中声孔效应 DNA 表达的部位。

## 致谢

我们感谢 Olivier Pourquie、Richard R. Behringer、Andrew McMahon、Juan-Carlos Izpisua Belmonte、Urlich Ruther、Matthew Scott 和 Cliff Tabin 等博士提供的试剂和建议以及 Shiho Kitagawa 小姐提供的帮助。请与 Richmar 公司 [www.richmarweb.com]（Jim Whittaker 先生 [jwhittaker@richmarweb.com]）和 Ken Coffey 先生 [coffeyk@aol.com] 和 Nepagene 公司 [www.nepagene.jp]（Yasuhiko Hayakawa 先生 [y-hayaka@nepagene.jp]）进行联系。本研究项目受到日本国教育、文化、体育、科学和技术省的 21 世界 COE 研究项目，科学研究优先领域（A）以及癌症研究的提高等项目的资助。

# 参考文献


Morgan B.A. and Fekete D.M. 1996. Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol.* **51:** 185–218.

Nakamura H. and Funahashi J. 2001. Introduction of DNA into chick embryos by in ovo electroporation. *Methods* **24:** 43–48.

Ohta S., Suzuki K., Tachibana K., and Yamada G. 2003. Microbubble-enhanced sonoporation: Efficient gene transduction technique for chick embryos. *Genesis* **37:** 91–101.

Tachibana K. and Tachibana S. 1995. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation* **92:** 1148–1150.

———. 2001. The use of ultrasound for drug delivery. *Echocardiography* **18:** 323–328.

Yamada G., Nakamura S., Haraguchi R., Sakai M., Terashi T., Sakisaka S., Toyoda T., Ogino Y., Hatanaka H., and Kaneda Y. 1997. An efficient liposome-mediated gene transfer into the branchial arch, neural tube and the heart of chick embryos; a strategy to elucidate the organogenesis. *Cell. Mol. Biol.* **43:** 1165–1169.

# 第七十一章　通过微注射操作哺乳动物细胞的基因

David W. Rose

Department of Medicine and Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California 92093-0673

任开环　译



## 摘要

在多种将 DNA 和其他生物学材料导入细胞的可行方法中，微注射单个哺乳动物细胞是更具有操作技术难度的方法之一。同时，该技术依赖于相当昂贵的设备，并需要熟练技术员的实验技能。但该方法也具备其存在的合理原因。它允许以一定的浓度在一定数量的细胞中导入分子，并且可以严格控制实验时间，使过表达相关的问题降低到最少。也许微注射最有力的方面是同时将多种类型的试剂导入细胞的能力，包括构建的 DNA 产物、标记注射细胞的葡聚糖、抗体、短干扰 RNA（siRNA）和多肽（Lavinsky et al. 1998；Roae et al. 1998；Jepsen et al. 2000；Zhu et al. 2006）。其他任何一种可用技术都不具备这种能力。

通过微注射进行导入可以用于任何类型的贴壁细胞，包括原代细胞。由于任何靶基因的 siRNA 可以简单、快速地获得，因此，在几天内研究任意一种贴壁细胞的任一基因敲除后的多种效应时，这是一种相对简单的方法。此外，通过微注射进行导入保证了每个细胞都能以相对恒定的浓度获得 siRNA。该方法的许多缺点是与技术本身的挑战性相关：不容易学习，需要注重细节。该方法也存在某些技术上的缺点，如可以注射的细胞数目有限，因此通常不允许某些基于某些生化参数的效应的后续分析。该方法最主要的限制条件是所获得材料的数量少，但是随着分析技术的敏感性增加，该方法的可用性也增强了。

## 引言

通过微注射将构建的质粒导入受精卵，已经产生了多种转基因动物（Gordon et

al. 1980；Gordon 1993)。微注射已经广泛地用于降低胞内靶蛋白质活性或表达，最初是通过利用微注射的抗体（Bar-Sagi 1995；Lamb and Fernandez 1997；Torchia et al. 1997)。后来，除了抗体外，加入多种构建的质粒来恢复受影响的胞内蛋白质的活性，从而使该技术得到发展（Li et al. 1998)。在DNA构建产物再导入细胞前，在这些DNA中导入突变，从而使利用这种恢复手段在活细胞中研究结构-功能的关系以及蛋白质结构域与生物活性的关系成为可能（McInerney et al. 1998；Li et al. 2003)。微注射另一个重要的优点是微注射siRNA为抗体在微注射实验中的应用做了补充（Perissi et al. 2004)。事实上，该方法在多方面优于抗体的使用，这是因为利用靶向siRNA敲除蛋白质不影响其他蛋白质的活性，而这些蛋白质在利用抗体时可能与靶蛋白在一个复合物中。此外，事实上任一靶向siRNA的设计和合成都很简单。许多微注射的基本方面，尤其是抗体和DNA构建产物已经在其他地方详细描述（Rose et al. 1999；Ikeda 2004)。我们在此强调微注射在联合siRNA技术使用上的进步。

## 方案

# 将siRNA微注射入哺乳动物细胞

在这些实验中，对数百个细胞进行了注射，并通过荧光葡聚糖的存在进行鉴定。利用表达靶基因的构建产物进行的恢复实验可以持续进行直到它们被siRNA识别。我们通常利用其他种族的构建产物来避免这种问题，但将沉默突变导入靶基因来阻止识别也是可能的。后文描述了注射少数细胞的过程。

### 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

注射的细胞系（如在这使用的黏附细胞系）

荧光标记的葡聚糖（分子探针/Invitrogen）

我们推荐使用经氨基化学修饰后的葡聚糖，氨基使葡聚糖可以通过乙醛进行固定。同时也推荐使用分子质量在70kDa左右的葡聚糖来避免其穿过核膜。

寡聚核苷酸siRNA

利用供应商提供的网上软件可以设计目的基因的siRNA和对照siRNA。将寡聚核苷酸复性后制备成20μmol/L的储存液，−20℃储存。

siRNA样品缓冲液

5mmol/L磷酸钠（pH 7.2）

100mmol/L KCl<!>

#### 仪器

盖玻片（酸洗）

分析大多数实验结果的落射荧光显微镜

配备多个物镜的高质量倒置光学显微镜

半自动的微注射系统，包括注射电压、时间以及显微操作器和操作杆都可以调控。

微注射设备可以从多个生产厂家获得，并已经在其他地方详细描述（Rose et al. 1999；见Ikeda2004 的详细描述；King 2004）。微注射针可以购买得到；我们已经成功制造了我们自己的商业化注射针拆卸工具。

## 方法

1. 制备 siRNA 寡聚核苷酸（特异和对照的寡聚核苷酸）的工作液，siRNA 寡聚核苷酸在 siRNA 样品缓冲液中的浓度为 50nmol/L。在 siRNA 样品缓冲液中以 5mg/ml 溶解荧光标记的葡聚糖。
2. 制备微注射的 siRNA，将 siRNA 寡聚核苷酸的工作液 10 倍稀释成标记的葡聚糖溶液。

   该皮摩尔浓度有效，并且足以避免出现脱靶的非特异效应。
3. 将黏附细胞铺在酸洗的盖玻片上，长至合适的密度，约 50%汇合。

   在该点，如果需要使细胞静止，可以去除血清。
4. 按标准程序，利用制备的特异或对照 siRNA 样品进行核的显微注射（如见 King 2004 和图 1）。

   也可以使用适合研究系统的 DNA、肽以及其他活质分子（Zhu et al. 2006）。
5. 微注射后，将细胞孵育一段时间使靶蛋白足以敲除。

   该 siRNA 效应快速并具有特异性。在多数情况下，靶 mRNA 在注射后 6h 内用 RT-PCR 无法检测到变化。该过程的时间段随靶蛋白的半衰期而变化，但大多数调节蛋白的半衰期相对较短。
6. 分析适用于研究系统的细胞。

   该方法的一个重要方面是用于评价微注射的分析方法。siRNA 产生的表型必须利用一个客观的指标进行标定，尤其是一个能够将每个注射的单细胞以阳性或阴性进行划分的指标。好的样品可以利用溴脱氧尿苷掺入（Li et al. 2002）、适当标记物的免疫细胞化学染色（Klappacher et al. 2002）或者利用共注射的启动子/报道基因构建产物（Perissi et al. 2004；Zhu et al. 2006）。

## 在少量群体中注射单个细胞

另一个微注射 siRNA 的实际扩展是在少量群体中微注射单个细胞，总体导致任何预期靶基因在 48h 或更短时间内的功能性敲除。利用从不少于 100 个细胞中提取到的 RNA，通过 RT-PCR 或定量 PCR（qPCR），可以证明靶 mRNA 是否被有效敲除。也可以用相同的方法，通过选择性引物，定量确定基于其他任何基因表达的 siRNA 注射后的下游效应。这可以通过 qPCR 进行，而且，引入一个扩增步骤时，RNA 也可以通过低密度基因表达阵列进行分析（Perissi et al. 2004；Zhu et al. 2006）。

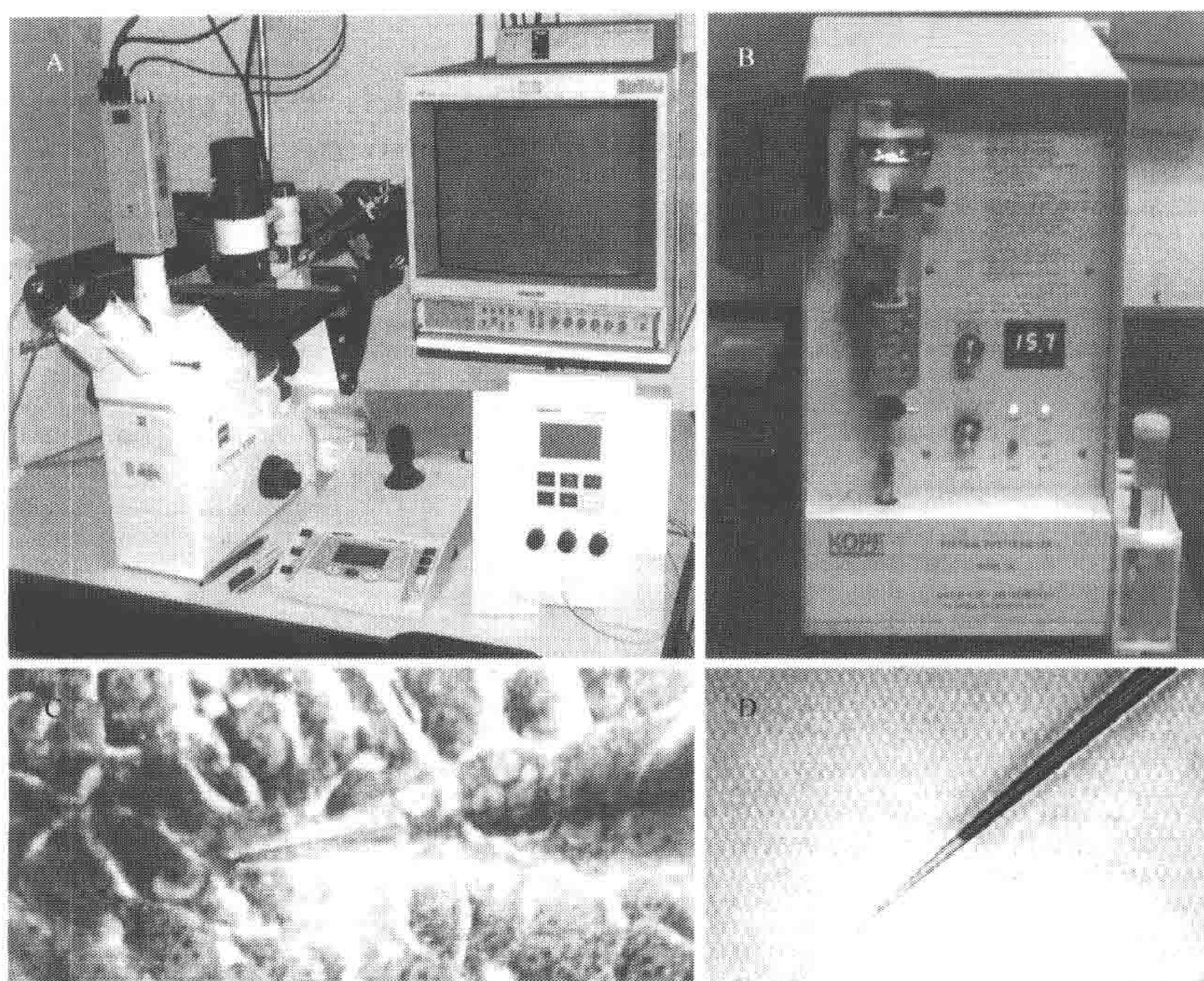



图 1．微注射方案。A. 典型的半自动微注射装置，由振动隔绝气桌、倒置显微镜、显微操作器、视频装置以及微量注射器组成。传动器装在显微镜边上，由操作杆进行操纵，操控显微针的移动，并附有记录针。在注射期间和注射间隙，由微量注射器控制正压。B. 垂直注射针拆卸工具。由一根毛细管同时产生两根相同的注射针。C. 在视频监测器上看到的核注射过程。D. 320×适用于核微注射 DNA 和抗体的尖端精制的理想注射针。

1. 以少量体积（一般 1μl 或者更少）将细胞铺在盖玻片的中央。
2. 放置 20min，使细胞黏附，接着加入其他介质。

   通过适当稀释，可以选择任何数量的细胞使其集中在一个非常小的区域中，使注射单个细胞成为可能。

3. 进行微注射并孵育细胞使其基因敲除。
4. 收集细胞的 RNA 并分析。

## 致谢

我们感谢 Clandia Santiago 和 Kelly Ou 所做的管理工作。Rose 实验室的成员特别是 Paul F. Kotol、Nathaniel dela Paz 和 Radin Aur 在开发实验方法工作中做了很大贡献。

# 参考文献


Bar-Sagi D. 1995 Mammalian cell microinjection assay. *Methods Enzymol.* **255:** 436–442.

Gordon J.W. 1993. Production of transgenic mice. *Methods Enzymol.* **25:** 747–771.

Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., and Ruddle F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77:** 7380–7384.

Ikeda S.R. 2004. Expression of G-protein signaling components in adult mammalian neurons by microinjection. *Methods Mol Biol.* **259:** 167–181.

Jepsen K., Hermanson O., Onami T.M., Gleiberman A.S., Lunyak V., McEvilly R.J., Kurokawa R., Kumar V., Liu F., Seto E., et al. 2000. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell.* **102:** 753–763.

King R. 2004. Gene delivery to mammalian cells by microinjection. *Methods Mol. Biol.* **45:** 167–174.

Klappacher G.W., Lunyak V., Sykes D., Sawka-Verhelle D., Sage J., Brard G., Ngo S.D., Gangardharan D., Jacks T., Kamps M.P., et al. 2002. Identification of an induced Ets repressor complex reveals a combinatorial mechanism directing growth arrest during terminal macrophage differentiation. *Cell* **109:** 169–180.

Lamb N.J.C. and Fernandez A. 1997. Microinjection of antibodies into mammalian cells. *Methods Enzymol.* **283:** 72–83.

Lavinsky R.M., Jepsen K., Heinzel T., Torchia J., Mullen T.-M., Schiff R., Del-Rio A.L., Ricote M., Ngo S., Gemsch J., et al. 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 2920–2925.

Li J., Tang H., Mullen T.-M., Westberg C., Rose D.W., and Wong-Staal F. 1998. A role for RNA Helicase A in post-transcriptional regulation of HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 709–714.

Li X., Perissi V., Liu F., Rose D.W., and Rosenfeld M.G. 2002. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* **297:** 1180–1183.

Li X., Oghi K.A., Zhang J., Krones A., Bush K.T., Glass C.K., Nigam S.K., Aggarwal A.K., Maas R., Rose D.W., and Rosenfeld M.G. 2003. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426:** 247–254.

McInerney E., Rose D.W., Flynn S.E., Westin S., Mullen T.-M., Krones A., Inostroza J., Nolte R.P., Assa-Munte N., Milburn M., Glass C.K., and Rosenfeld M.G. 1998. Coactivator LXXLL recognition motifs confer specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* **12:** 3357–3368.

Perissi V., Aggarwal A., Glass C.K., Rose D.W., and Rosenfeld M.G. 2004. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* **116:** 511–526.

Rose D.W., Mullen T.-M., Rosenfeld M.G., and Glass C.K. 1999. Functional characterization of coactivators using mammalian cell microinjection. In *Nuclear receptors: A practical approach* (ed. D. Picard), pp. 119–135. Oxford University Press, New York.

Rose D.W., Xiao S., Pillay T.S., Kolch W., and Olefsky J.M. 1998. Prolonged versus transient roles for early cell cycle signaling components. *Oncogene* **17:** 889–899.

Torchia J., Rose D.W., Inostroza J., Kamei Y., Glass C.K., and Rosenfeld M.G. 1997. The transcriptional coactivator p/CIP binds CBP and mediates nuclear receptor function. *Nature* **387:** 677–685.

Zhu P., Baek S.-H., Bourk E.M., Ohgi K.A., Garcia-Bassets I., Sanjo H., Akira S., Kotol P.F., Glass C.K., Rosenfeld M.G., and Rose D.W. 2006. Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance through a conserved nuclear receptor derepression pathway. *Cell* **124:** 615–629.

# 第七十二章　磁 力 转 染

Christian Plank[*] 和 Joseph Rosenecker[†]

[*] Institute of Experimental Oncology, Technische Universität München, 81675 Munich, Germany; [†] Department of Pediatrics, Ludwig-Maximilians-University, 80337 Munich, Germany

李保卫　译



## 摘要

磁力转染的定义是，通过磁力介导，用磁性颗粒运送核酸或核酸载体。载体可以结合到磁性颗粒上，磁性颗粒通常是氧化铁纳米颗粒，大多数情况下通过非共价键进行连接。磁力可以克服液体动力（hydrodynamic force），使得磁性载体聚集和/或停留在靶组织区域。在细胞培养中，磁性载体可以在几分钟之内沉降到靶细胞。这样就克服了核酸运送中的扩散障碍，所有的载体都与靶细胞紧密接触，遗传物质进入细胞可以实现同步化。核酸运送速度大大加快，很多载体的感染效率提高。磁力转染可以用于小分子和大分子核酸运送，它的其他优点包括，需要的给药剂量低，可以限制核酸进入到一个局部区域（磁力靶向区），便于高通量自动控制。由于其具有良好的剂量-效应特征和快速的动力学特征，载体相关的毒性可以被控制在较低的程度（Krotz et al. 2003）。

磁力转染有其局限性。磁力转染非常便利，有时通过简单的离心程序就可以达到类似的功效（Huth et al. 2004）。磁力转染对贴壁细胞比悬浮细胞更为有效。该方法的真正局限性是在体内试验中，没有合适的磁场技术可以克服高血流速率而将磁性纳米颗粒聚集。标准载体的局限性依然存在（如易被吞噬和激发免疫活性）。但是随着磁场技术的进步以及磁力载体制剂的改善，预期这种方法在不久的将来会得到应用。

## 引言

载体成功运送（功能性地将核酸运送到预期的亚细胞区域）其实是克服个体屏障进行运送的结果。无论是什么载体类型，如果载体与靶细胞直接接触的概率很低，则核酸总体运送至靶器官的效率也会很低。Luo 和 Saltzman（2000）指出，DNA 转染效率由一个简单的物理屏障所限制：细胞表面只有很低浓度的 DNA。至少在细胞培养过程中，人们发现，载体-细胞直接接触是通过一个非常慢的扩散过程进行的。在细胞吸收 DNA 饱和浓度之下，对于一个给定的剂量，任何可以提高靶细胞表面载体浓度的方法都可以

提高核酸进入细胞的效率。这些方法可以通过物理作用力（包括重力、离心力和水动力），以及电场和磁场力。磁力转染探索如何利用磁场力将载体聚集和（或）滞留在靶区域。该方法将所有的载体沉降在靶细胞表面，所以与标准的转染方法相比，使用的载体剂量通常可以显著降低（通常为标准剂量的1/10）。

磁力转染的机制可能与涉及载体细胞内吞作用的标准转染和转导方法一样（Huth et al. 2004）。磁性氧化铁颗粒与载体偶联进入细胞，通过很长的周期被生物降解。磁力转染适用于小分子和大分子核酸，这里的核酸可以人工合成，包括小干扰RNA（siRNA），也可以是生物来源的（质粒DNA和大分子），裸露的或包裹在载体制剂之内的（脂质体复合物，多聚物）（Scherer et al. 2002）。磁力转染也可以用于病毒载体，正在进行的研究包括腺病毒（Pandori et al. 2002；Scherer et al. 2002；Mok et al. 2005）、腺相关病毒（AAV）（Mah et al. 2002）、反转录病毒（Hughes et al. 2001；Scherer et al. 2002）、慢病毒（Haim et al. 2005）、杆状病毒（Raty et al. 2004）和麻疹病毒（Kadota et al. 2005）。依赖病毒表面特征，病毒和磁性颗粒通过静电相互作用形成复合物。

链霉亲和素包被的磁性颗粒也被用于磁力转染。载体与这些颗粒的联系至少需要一种载体成分［核酸和（或）多聚阳离子或阳离子脂质体］或病毒载体本身被生物素标记。很多偶联了链霉亲和素磁性颗粒病毒被用于磁力转染（Hughes et al. 2001；Mah et al. 2002；Pandori et al. 2002；Raty et al.，2004；Mok et al. 2005）。用于磁力转染的磁片可做成圆形或长方形的，用胶带黏附在细胞培养瓶的底部。核酸在培养瓶内的运送被限制在磁片磁场所在的区域。在体内进行磁力转染试验时，需要面积大、具有恒久磁力的磁片，或者能提供较大区域磁场的强力电磁石。但是到目前为止，还没有商业提供用于体内药物磁力靶向运送的磁力技术。有兴趣的读者如果想知道更多的建议，可以联系本章的作者。

本文引用的多数病毒载体操作步骤都是独立摸索出来的。很多作者不使用“磁力转染”这个术语来命名其操作过程。本文使用磁力转染仅仅简单用于概括各种磁力介导的核酸运送。关于这个方面有些综述可供参考（Plank et al. 2003a，b；Schillinger et al. 2005）。图1概括了整个操作流程。

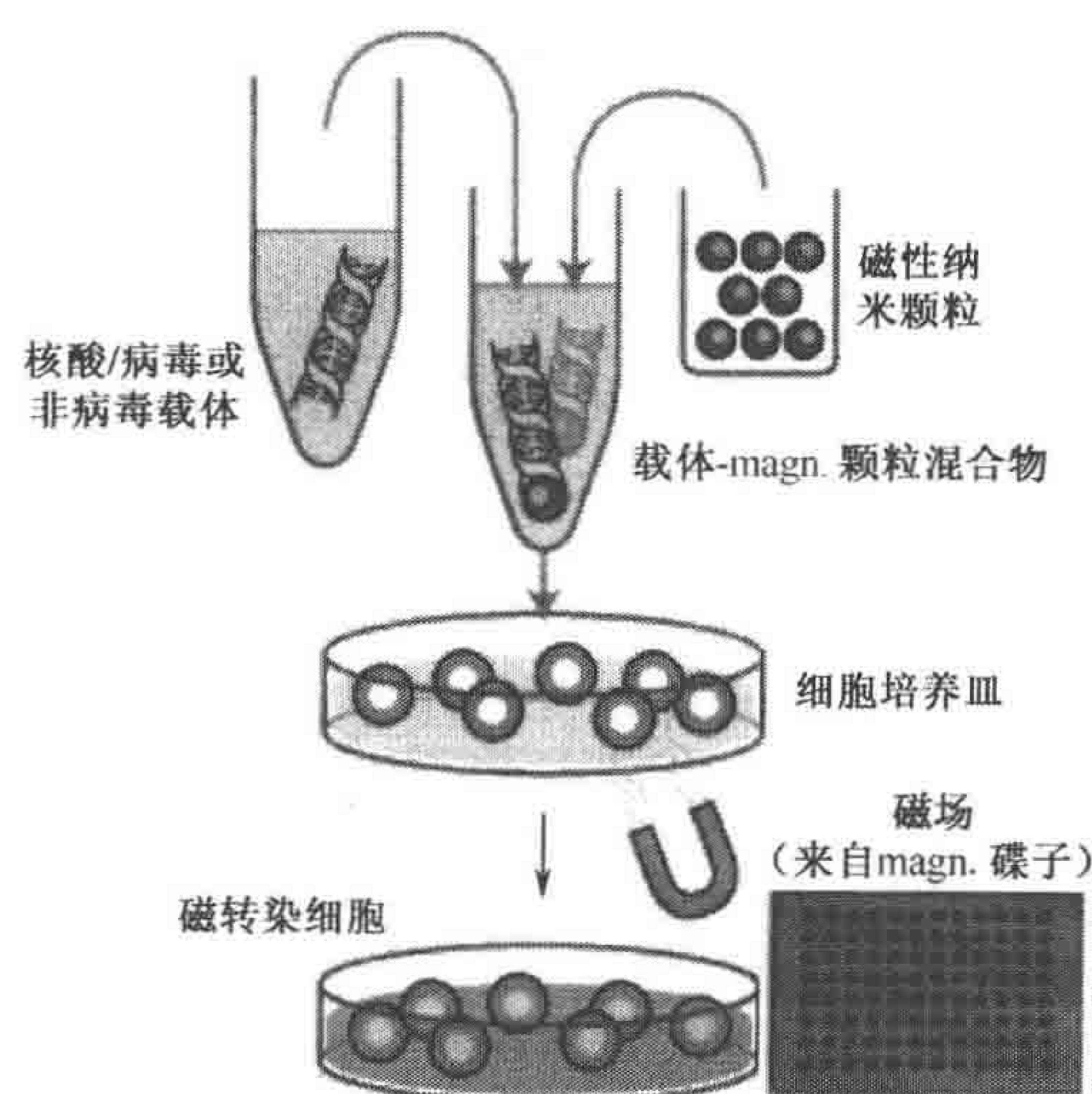



图1. 磁力转染的原理。按最简单的组成，磁力转染系统包括，裸露核酸或载体被多聚阳离子或多聚阴离子包被的磁性纳米颗粒。上述复合物通过电子相互作用和（或）盐诱导聚集作用而自发形成。另外，一些生物相互作用，如生物素-链霉亲和素，或化学偶联生物功能分子也可以加以选择利用。放在细胞培养瓶下端具有持久磁场力的磁体可以将溶液中的载体沉降到细胞表面，从而有助于核酸进入细胞。为此，现在有很多适应细胞培养容器的磁性碟子可供使用（Scherer et al. 2002）。

方案

# 使用磁性纳米颗粒进行核酸运送

该方案使用磁性纳米颗粒，用非病毒或病毒载体来进行细胞靶向核酸运送。

## 材料

**注意**：标有< !>的材料的处理方法请见附录。

### 试剂

细胞

最好提前一天将准备用于磁力转染的细胞按标准的核酸运送方法铺平板。对非病毒磁力转染，细胞应长满瓶底60%～80%。各种不同器皿建议的细胞数目参见表1。表1中培养液的加入体积等于“最终转染体积”减去“准备转染载体的体积”。

**表1. 非病毒载体转染时，建议的细胞数目、DNA/核酸剂量和转染体积**

| 细胞培养器皿 | 细胞数目/个 | 每孔所需磁性颗粒量/(μg/孔) | 制备的载体体积/ml | 最终转染体积/ml |
|---|---|---|---|---|
| 96孔板 | $0.5\times10^4\sim2\times10^4$ | 0.1～1 | 0.05 | 0.2 |
| 24孔板 | $0.5\times10^5\sim1\times10^5$ | 1～10 | 0.1～0.2 | 0.5～1 |
| 12孔板 | $1\times10^5\sim2\times10^5$ | 2～20 | 0.15～0.3 | 1.5 |
| 6孔板 | $2\times10^5\sim4\times10^5$ | 4～40 | 0.2～0.6 | 2～3 |
| 60mm碟子 | $5\times10^5\sim10\times10^5$ | 10～50 | 0.5～1.6 | 5～8 |
| 90～100mm碟子 | $10\times10^5\sim20\times10^5$ | 30～150 | 0.5～2 | 10～20 |
| T-25培养瓶 | $5\times10^5\sim10\times10^5$ | 10～50 | 0.5～2 | 5～10 |
| T-75培养瓶 | $20\times10^5\sim50\times10^5$ | 30～150 | 0.5～2 | 15～20 |

转染体积＝总转染体积＝制备的用于转染的载体体积＋培养皿中培养液的体积。

培养液使用DMEM或其他合适的细胞培养液

磁性颗粒

外层(含氨基、羧基基团或磷酸基团)包被聚阳离子或聚阴离子,或包被链霉亲和素的氧化铁纳米颗粒购自OZ生物科学公司(Marseille,法国;www.ozbioscience.com),chemicell(柏林,德国;www.chemicell.com),New England Biolabs(www.neb.com),Bangs Laboratories(Fishers;www.bangslabs.com),Miltenyi Biotech(Bergisch-Gladbach,德国;www.miltenyibiotec.com),Dynal(www.dynabiotech.com),和Promega(www.promega.com)。纳米颗粒的直径应当不超过1μm,最好不超过500nm。用于磁力转染磁性纳米颗粒的设计和优化已经商品化，如来自OZ Bioscience或chemicell的CombiMAG，PolyMAG和silenceMAG。

核酸载体

任何已知的载体都可以用于磁力转染。如果使用链霉亲和素包被的磁性颗粒，则载体必须是亲和素标记的。具体操作说明，详见生物素试剂提供厂家（如Sigma-Aldrich或Pierce公

司）的操作手册。对聚阳离子或聚阴离子包被的磁性颗粒，如 CombiMAG，不需要对载体进行亲和素偶联。病毒载体可以使用亲和素偶联，并且使用相应的链霉亲和素蛋白包被磁性颗粒。或者将载体与磁性颗粒共孵育即可［最好使用阳离子包被磁性颗粒，但是阴离子包被颗粒可用于慢病毒（Haim et al. 2005)］。

磷酸盐缓冲液（PBS），HEPES 缓冲盐溶液（HBS），0.9%的 NaCl，或用于载体制备的无血清细胞培养基。

转染试剂的选择

## 仪器

37℃细胞孵箱

微量离心管

永久磁体

稀土永久磁体(rare earth permanent magnet)是最合适的磁体，例如，钕铁硼磁体(neodymium iron boron magnet )。制造厂商包括 IBS Magnet(柏林，德国)，Dexter Magetic Technologies (芝加哥，伊利诺伊州)，Bisbell Magnetic product Ltd.（Burton-on-Trent，英国)，或者 amf magnetic(Mascot，澳大利亚)。设计和优化用于磁力转染的磁碟已经商业化生产，可以从 OZ Bioscience（Marseille，法国；www.ozbioscience.com）或 chemicell（柏林，德国；www.chemicell.com)购买。

最实用的磁片是圆形的，直径 0.5cm、1cm、1.5cm、2cm 或更大，厚度 0.5cm。长方体磁片的尺寸为 2cm×1cm×0.5cm。

**注意**：稀土永久磁体会产生永久的磁场，必须小心操作。这些磁体可以删除磁存储设备，干扰电子或电子机械设备（如心脏起搏器）的正常工作。

细胞培养器皿的选择参见表 1。

## 方法

对每一种磁性颗粒和载体类型，磁性颗粒与基因载体的比例必须进行优化。具体的优化方法参见 www.ozbiosciences.com.

1. 用去离子水制备 1mg/ml 的磁性纳米颗粒。

   多数厂商提供的磁性纳米颗粒以不同浓度（mg/ml）的液体悬浮溶液形式提供。多聚阳离子和多聚阴离子包被的磁性颗粒在含盐溶液中会自发聚集。

2. 计算需要的磁性纳米颗粒的量。对非病毒载体，按每微克核酸使用 0.2～4μg 外层包被的磁性颗粒进行运送；15μg 聚氮丙啶（polyethylenimine）包被的磁性颗粒足以结合 $1\times10^{10}$ 的腺病毒颗粒。不同培养器皿推荐加入的核酸剂量、非病毒载体转染参见表 1，病毒载体磁力转染见表 2。加入需要量的磁性颗粒到一个微量离心管中。

**表 2．病毒磁力转染时，建议的细胞数目、磁粒剂量和转染体积**

| 细胞培养器皿 | 细胞数目/个 | 转染 DNA 量/μg | 制备的载体体积/ml | 最终转染体积/ml |
|---|---|---|---|---|
| 96 孔板 | $0.2\times10^4\sim2\times10^4$ | 0.01～1 | 0.05 | 0.2 |
| 24 孔板 | $0.5\times10^5\sim1\times10^5$ | 0.2～10 | 0.1～0.2 | 0.5～1 |
| 12 孔板 | $1\times10^5\sim2\times10^5$ | 0.2～20 | 0.15～0.3 | 1.5 |
| 6 孔板 | $2\times10^5\sim4\times10^5$ | 0.5～35 | 0.2～0.6 | 2～3 |
| 60mm 碟子 | $5\times10^5\sim10\times10^5$ | 1～100 | 0.5～1.6 | 5～8 |
| 90～100mm 碟子 | $10\times10^5\sim20\times10^5$ | 1～60 | 0.5～2 | 10～20 |
| T-25 培养瓶 | $5\times10^5\sim10\times10^5$ | 0.2～20 | 0.5～2 | 5～10 |
| T-75 培养瓶 | $20\times10^5\sim50\times10^5$ | 1～60 | 0.5～2 | 15～20 |

转染体积＝总转染体积＝制备的用于转染的载体体积＋培养皿中培养液的体积。根据经验，非病毒载体转染时，核酸的最终浓度不要超过 100μg/ml，最好不超过 50μg/ml。

3. 制备非病毒或病毒载体。

**对非病毒载体**

a. 根据转染试剂厂家提供的说明书制备载体。制备的载体要溶在含盐溶液中，最好是血清和无补体细胞培养液中，如 DMEM、0.9% 的 NaCl、PBS 或 HBS。

b. 混合核酸与转染试剂，立即将混合物转移到磁性颗粒溶液中。用移液器吹吸混匀。

**对病毒载体**

a. 如果需要，用无血清细胞培养液或其他含盐缓冲液稀释制备的病毒制剂。或者直接使用一个病毒制备细胞系的培养上清。

b. 将病毒稀释溶液转移到磁性颗粒溶液中，用移液器吹吸混匀。

重要：不要使用聚阳离子添加剂，如 polybrene，其常用于标准转导程序中。

4. 室温孵育 15～30min。对病毒载体放在冰上。在这段时间内磁性颗粒和载体偶联。
5. 加入磁性载体制剂到靶细胞中。将细胞培养器皿放在一个商用的磁碟上，或者将合适的永久磁片用胶带贴在细胞培养器皿的底部。
6. 将细胞放在孵箱或室温 15～30min，然后去掉磁体。
7. 备选：更换培养基或者补充加入更多的培养基，在标准条件下继续培养，直到转染实验完毕进行分析。

磁力转染也可以使用链霉亲和素包被的磁性颗粒和生物素标记的载体按上面的操作程序进行实验。使用非病毒载体的一个潜在限制为，转染试剂如阳离子脂质体或多聚阳离子通常大大超过了核酸组分的量，这些多余的试剂不会直接与核酸偶联，而会阻挡链霉亲和素包被磁性颗粒的结合位点。

# 参考文献


Haim H., Steiner I., and Panet A. 2005. Synchronized infection of cell cultures by magnetically controlled virus. *J. Virol.* **79:** 622–625.

Hughes C., Galea-Lauri J., Farzaneh F., and Darling D. 2001. Streptavidin paramagnetic particles provide a choice of three affinity-based capture and magnetic concentration strategies for retroviral vectors. *Mol. Ther.* **3:** 623–630.

Huth S., Lausier J., Gersting S.W., Rudolph C., Plank C., Welsch U., and Rosenecker J. 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J. Gene Med.* **6:** 923–936.

Kadota S.I., Kanayama T., Miyajima N., Takeuchi K., and Nagata K. 2005. Enhancing of measles virus infection by magnetofection. *J. Virol. Methods* **128:** 61–66.

Krotz F., Wit C., Sohn H.Y., Zahler S., Gloe T., Pohl U., and Plank C. 2003. Magnetofection—A highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **7:** 700–710.

Luo D. and Saltzman W.M. 2000. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat. Biotechnol.* **18:** 893–895.

Mah C., Fraites T.J.J., Zolotukhin I., Song S., Flotte T.R., Dobson J., Batich C., and Byrne B.J. 2002. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy. *Mol. Ther.* **6:** 106–112.

Mok H., Palmer D.J., Ng P., and Barry M.A. 2005. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol. Ther.* **11:** 66–79.

Pandori M.W., Hobson D.A., and Sano T. 2002. Adenovirus-microbead conjugates possess enhanced infectivity: A new strategy to localized gene delivery. 2002. *Virology* **299:** 204–212.

Plank C., Anton M., Rudolph C., Rosenecker J., and Krotz F. 2003a. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3:** 745–758.

Plank C., Schillinger U., Scherer F., Bergemann C., Remy J.S., Krotz F., Anton M., Lausier J., and Rosenecker J. 2003b. The magnetofection method: Using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.* **384:** 737–747.

Raty J.K., Airenne K.J., Marttila A.T., Marjomaki V., Hytonen V.P., Lehtolainen P., Laitinen O.H., Mahonen A.J., Kulomaa M.S., and Yla-Herttuala S. 2004. Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol. Ther.* **9:** 282–291.

Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henke J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B., and Plank C. 2002. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **9:** 102–109.

Schillinger U., Brill T., Rudolph C., Huth S., Gersting S., Krotz F., Hirschberger J., Bergemann C., and Plank C. 2005. Advances in Magnetofection—Magnetically guided nucleic acid delivery. *J. Magn. Magn. Mat.* **293**: 501–508.

# 第七十三章　用于光指导的基因传递的光化学内化技术

Anette Bonsted[*]，Anders Hϕgset[†]，Ernst Wagner[‡]和 Kristian Berg[*]

[*] Department of Radiation Biology, Institute for Cancer Research, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, Montebello, N-0310 Oslo, Norway;[†] PCI Biotech AS, Hoffsvn 48, N-0310 Oslo, Norway;[‡] Pharmaceutical Biology-Biotechnology, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universitat, D-81377 Munich, Germany

何红伟　译



## 摘要

光化学内化（photochemical internalization，PCI）可以通过光定向破坏细胞的内吞小泡的机制得到高效的转染（Berg et al. 1999）。这项技术的原理是先将光敏剂定位于细胞内吞小泡的膜上，然后光照导致膜的破裂。内吞化合物（如核酸）就释放到细胞质中作用于其靶点或进一步转运到细胞核中。（图 1）

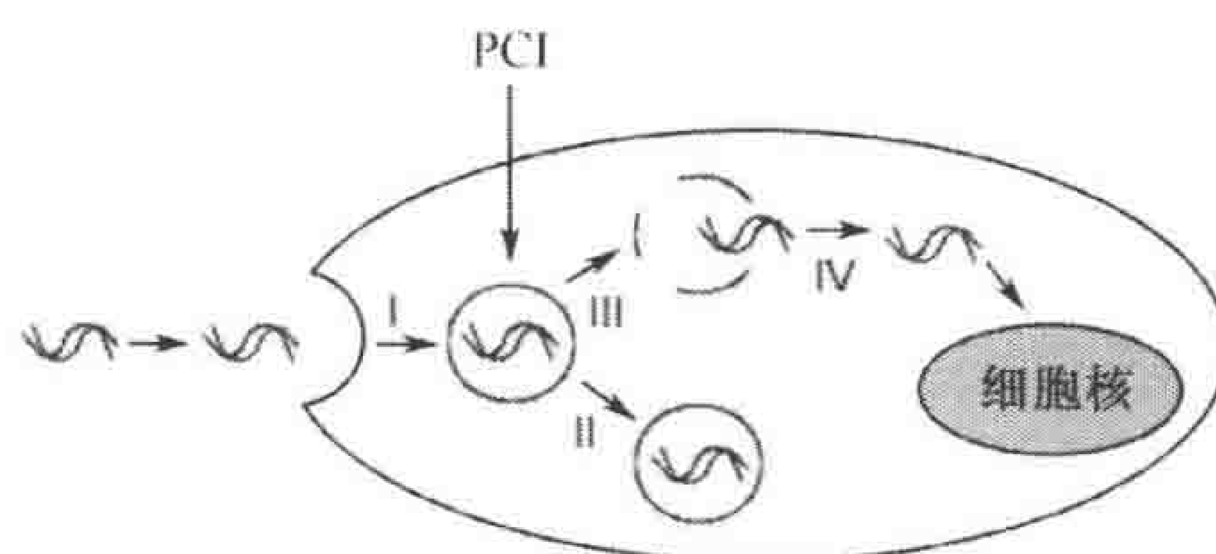



图 1. 光化学内化介导的核酸转运。核酸被吞入细胞并形成内吞小泡（I）。如果没有转移，核酸在内吞小泡中被降解（II）。光化学内化穿透内吞小泡的膜（III），导致核酸释放到细胞质中（IV）。

光化学内化充分增强了非病毒载体如质粒聚合物和肽核酸等的转运（Hogset et al. 2000；Folini et al. 2003）。光化学内化也能增强腺病毒和腺相关病毒载体的基因转运（Hogset et al. 2002；Bonsted et al. 2005）。当不介意 100%被处理细胞都需要存活的时候，这项技术还可用于在体内和体外转染或转导细胞。光化学处理的效果依赖于曝光度，建立光化学内化为高特异性处理形式。此外，通过组合光化学处理与靶向特殊细胞表面受体的基因载体可以实现联合双靶向的转运（Kloechner et al. 2004）。构建单独情

况下自身不会有效的光化学内化基因载体形式可能降低在非靶细胞转基因并非特异表达带来副作用的风险。另外，增强效果的光化学内化需要的载体数量较少，能最小化载体相关的毒性和免疫原性。光化学处理腺病毒能应用于缓慢分裂细胞或非分裂细胞。由光化学处理诱发的细胞毒性可能在某些基因治疗应用存在缺陷，但是它已经在癌症治疗的光动力治疗（photodynamic therapy，PDT）中得到成功的应用。通过降低光的剂量有可能降低细胞毒性。然而，这也可能降低光化学处理引起的转染/转导的效果。因此，现在光化学内化很适合于切除组织为主要目的的治疗中。

## 引言

光化学内化的转染效果受如下因素影响：光敏剂、光剂量和前面提到的基因载体。光敏剂是化合物，在特定波长吸收光，导致化学和物理结构改变成为别的化合物。光化学反应是由光化学内化过程中应用的光敏剂诱导产生的，其过程主要是在被刺激的光敏剂与常态氧（$O_2$）之间作用后产生高反应性形式的氧（单态氧，$^1O_2$）。在细胞中单态氧只有很短的存在时间（<0.04s）和很窄的反应范围（10～20nm）（Moan and Berg 1991）。因此，只有非常接近光敏剂的物质才会被光照影响，而远距离的分子不会被影响。

要注意的是，铝酞菁（aluminum phthalocyanine）在相邻的苯环上有两个磺酸基（$AlPcS_{2a}$），mesotetraphenylporphine 在相邻的苯环上有两个磺酸基（$TPPS_{2a}$），它们是增强基因转运的最有效的光敏剂（图 2A）（Prasmickaite et al. 2001）。这些兼性分子的光敏剂定位于内吞小泡的膜上（Berg and Moan 1994）。光源可以是任何具备能被光敏剂吸收的波长的激发光。例如，红光源（峰波长位于 670nm）可用于激发 $AlPcS_{2a}$，蓝光源（峰波长位于 420nm）可以激发 $TPPS_{2a}$。如果光敏剂定位于细胞结构而不是内吞小泡，就不能有效诱发光化学内化效应（Berg et al. 1999；Prasmickaite et al. 2001）。

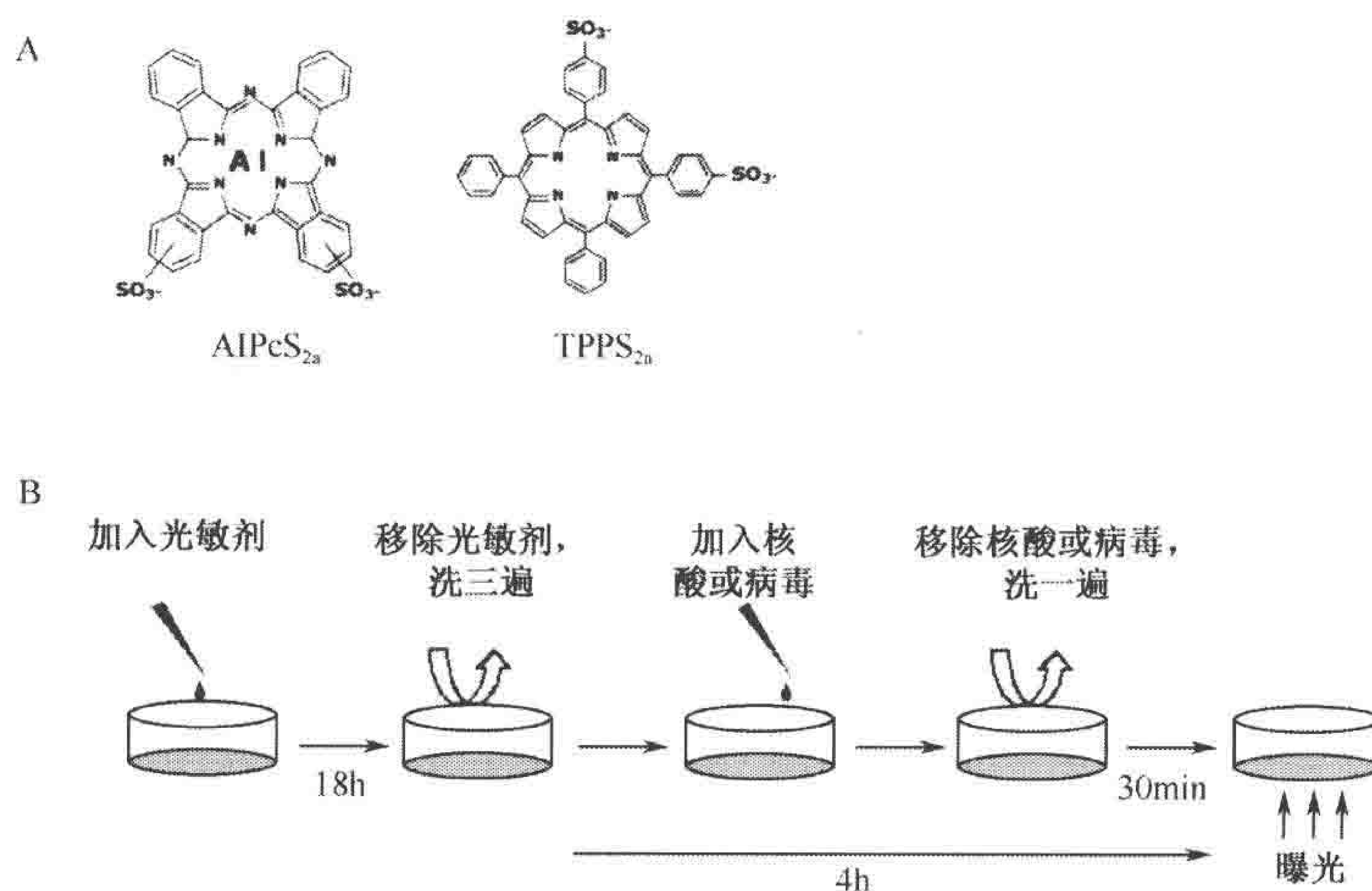



图 2. A. 应用于光化学内化的光敏剂的化学结构；B. 光化学内化实验流程。光敏剂（S）加入培养细胞中孵育 18h，然后清洗细胞，加入所需核酸或重组病毒孵育，然后在适当波长的光源下曝光。

**表 1．应用光化学内化的体外和体内基因治疗研究**

| 载体 | 光敏剂 | 细胞株 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| (a)体外实验 | | | |
| 非特异非病毒载体 | | | |
| 多聚 L-赖氨酸(含报道基因 EGFP) | $TPPS_{2a}$ | HCT116,THX; | Hogset et al.(2000) |
| | $AlPcS_{2a}$ | HCT116,THX; | Prasmickaite et al.(2000) |
| | | THX; | Prasmickaite et al.(2001) |
| | | CME-1,SW982 | Dietze et al.(2003) |
| | | U87MG,GaMg | Bonsted et al.(2005) |
| PEI(含报道基因 EGFP 和萤光素酶,治疗性基因 HSV-胸腺嘧啶脱氧核苷激酶) | $TPPS_{2a}$ | HCT116,THX; | Prasmickaite et al.(2000) |
| | $AlPcS_{2a}$ | U87MG | Prasmickaite et al.(2004) |
| | | HUH7,A431,HepG2 | Kloeckner et al.(2004) |
| 阳离子脂质体(含报道基因 EGFP) | $AlPcS_{2a}$ | HCT116,THX,BL2-G-E6 | Berg et al.(1999) |
| 肽核酸(PNA) | $TPPS_{2a}$<br>$AlPcS_{2a}$ | DU145 | Folini et al.(2003) |
| 靶向非病毒载体 | | | |
| EGFR 靶向的 PEI(含报道基因 EGFP 和萤光素酶,治疗性基因 HSV-胸腺嘧啶脱氧核苷激酶) | $TPPS_{2a}$<br>$AlPcS_{2a}$ | HUH7,HepG2,A431 | Kloeckner et al.(2004) |
| 糖基化 PEI(含 p53 基因) | $TPPS_{2a}$ | FaDu,PANC3 | Ndoye et al.(2004a,b) |
| PEI(含 PTEN 基因) | $TPPS_{2a}$ | Ishikawa | Maurice-Duelli et al.(2004) |
| 非靶向病毒载体 | | | |
| AdCMV-lacZ | $AlPcS_{2a}$ | WiDr,HCT116 | Hogset et al.(2002) |
| | $TPPS_{2a}$ | CME-1,SW982 | Dietze et al.(2003) |
| | | WiDr, FEMXIII, HeLa, HuFib; | Bonsted et al.(2004) |
| | | U87MG, GaMg; | Bonsted et al.(2005) |
| | | WiDr, A549, FEMXIII, HeLa, HuFib, RaJi; | Engesater et al.(2005) |
| | | THX*, OHS*, SaOS*, FLS* | |
| AdCMV-EGFP | $TPPS_{2a}$ | WiDr*, HCT116*, THX* | |
| AdCMV-luc | $TPPS_{2a}$ | WiDr* | |
| AdCMV-TRAIL | $TPPS_{2a}$ | WiDr, HCT116, OHS*, SaOS* | B. O. Engesater et al.(未出版) |
| 靶向病毒载体 | | | |
| AdRGD-GFP | $TPPS_{2a}$ | WiDr | Engesater et al.(2005) |
| 靶向 EGFR 的 AdRGD-lacZ | $TPPS_{2a}$ | DU145,RD | Bonsted et al.(2005) |
| (b)体内实验 | | | |
| 质粒(含 p53 基因) | $AlPcS_{2a}$ | 人类头颈部肿瘤移植模型 | Ndoye et al.(2006) |

*表示尚未发表的实验数据。EGFR：表皮生长因子受体；AdRGD-GFP：腺病毒，在病毒衣壳纤维蛋白（fiber）中的 knob 结构域的 HI 环含 RGD 肽表位，并可以由 CMV 启动子驱动表达绿色荧光蛋白。

光化学内化增强数个非病毒和病毒起源的基因载体的基因转运（表 1）。注意，光化学内化的相关效果主要在低于最佳剂量的 DNA-载体复合物［如质粒 DNA-多聚赖氨酸复合物在氮磷比（N：P）≤4，重组腺病毒载体剂量在感染滴度（multiplicities of infection）≤20］。通常，细胞用光敏剂处理，然后用基因载体处理，最后光照处理（Hogset et al. 2000；Prasmickaite et al. 2000）。这个实验方案在后面会详细解释。也可以这么做，细胞用光敏剂处理并曝光，然后加基因载体，当基因载体加入后 3～6h 再光照（Prasmickaite et al. 2002）。

可用于诱导光化学基因转运的光化学剂量必须按照不同的细胞系、光敏剂和光源单独确定。可用光敏剂预处理后光照后的细胞的存活情况来决定光源的光剂量。例如，用 5～20μg/ml 的 $AlPcS_{2a}$ 或 0.2～1μg/ml 的 $TPPS_{2a}$，光照后杀死 50%的细胞的光剂量可以作为光化学增强基因转运的起始点。细胞存活率可采用通常的细胞存活检测方法入 MTT（3-［4，5-二甲基噻唑-2］-(2，5)-二苯基溴化四氮唑蓝）法、克隆形成法、蛋白质分析或其他实验室建立的方法来衡量。所有非直接的细胞存活分析都应在曝光后 24～48h 后完成，因为至少需要 24h 才能足够释放光化学处理产生的细胞毒作用。

## 方案

# 光化学增强基因转运

这个实验方案描述了应用光敏剂增强光照后的细胞的 DNA 导入。

### 材料

**注意**：标有＜!＞的材料的处理方法见附录。

#### 试剂

准备转染的细胞

适当的细胞培养液

核酸或重组病毒

在使用之前用细胞培养液新鲜稀释核酸（如 DNA 多聚物），用无血清的细胞培养液或 PBS 按照感染滴度新鲜稀释重组腺病毒、腺相关病毒或其他可能内吞的病毒。

DNA 或病毒载体的使用数量要根据细胞株和载体的具体情况定。我们推荐使用 DNA 浓度为 0.2～5μg/ml，病毒的起始感染滴度为 5 个感染颗粒/细胞。

磷酸盐缓冲液（PBS）

光敏剂：$AlPcS_{2a}$ 或 $TPPS_{2a}$（Porphyrin 产品，Logan，Utah）

光敏剂的储存溶液的配置：溶解 5mg 的 AlPcS2a 或 2mg 的 TPPS2a 于 0.2ml 0.1mol/L 的 NaOH 中，用无菌 PBS 加至终体积为 1ml。过滤除菌，分装，储存于－20℃，最长 6 个月。使用光敏剂溶液时要注意避光。也要避免长时间的储存或反复冻融，否则会造成光敏剂聚合，导致效果下降。光敏剂溶液如果溶解不完全可以用超声仪处理几秒钟。

氢氧化钠（NaOH；0.1mol/L）＜!＞

## 仪器

$CO_2$培养箱，37℃

光源，670nm（$AlPcS_{2a}$）或420nm（$TPPS_{2a}$）：LumiSource（PCI Biotech，AS，Oslo，Norway）

细胞培养皿

## 方法

简单的实验计划，参见图2B。

1. 接种细胞于细胞培养皿中，使细胞贴壁。

   培养皿的选择根据分析方法而定。例如，如果用流式细胞仪考察细胞的转基因表达效率，则可采用12孔板（Nunc，Roskilde，丹麦），每孔铺75 000个细胞。

2. 准备工作浓度的光敏剂，在使用之前用细胞培养液稀释。用5～20μg/ml的$AlPcS_{2a}$或0.2～1μg/ml的$TPPS_{2a}$。

   光敏剂浓度要根据光源、光强和光敏剂的吸收谱覆盖的波长范围定。要确保所有的步骤都在非激发光下操作以避免不可控的光敏剂激活，保护细胞不受光化学伤害。体外实验时可以关掉实验台的灯。

3. 移除细胞培养液并加入含光敏剂的细胞培养液。在37℃，$CO_2$培养箱中培养16～18h。

4. 移除含光敏剂的细胞培养液，用无光敏剂的细胞培养液洗3次。继续37℃培养4h。在此期间，在指定的时间点加入核酸（如DNA多聚物）或重组病毒载体溶液。推荐的培养时间是：非病毒基因载体3.5h，重组病毒载体30min。

   如果用光化学内化转运药物，同时加入光敏剂和大分子药物然后孵育细胞（如在移除光敏剂之前培养18h）。然而，核酸转运时推荐先加光敏剂孵育然后加核酸。

5. 移除载体并洗一遍细胞。37℃，$CO_2$培养箱中孵育30min。

6. 将细胞曝光，采用的光剂量依据前言中的介绍来确定。

   如果想降低细胞膜的损伤，在无光敏剂中培养细胞1～4h后再曝光。

7. 将细胞放在黑暗环境中继续培养24～48h后分析转基因效率。

### 参考文献


Berg K. and Moan J. 1994. Lysosomes as photochemical targets. *Int. J. Cancer* **59:** 814–822.

Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L., Tjelle T.E., Sandvig K., Moan J., Gaudernack G., Fodstad Ø., Kjølsrud S., Anholt H., Rodal G.H., Rodal S.K., and Høgset A. 1999. Photochemical internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.* **59:** 1180–1183.

Bonsted A., Høgset A., Hoover F., and Berg K. 2005. Photochemical enhancement of gene delivery to glioblastoma cells is dependent on the vector applied. *Anticancer Res.* **25:** 291–298.

Bonsted A., Engesæter B.Ø., Høgset A., Mælandsmo G.M., Prasmickaite L., Kaalhus O., and Berg K. 2004. Transgene expression is increased by photochemically mediated transduction of polycation-complexed adenoviruses. *Gene Ther.* **11:** 152–160.

Bonsted A., Engesæter B.Ø., Høgset A., Mælandsmo G.M., Prasmickaite L., D'Oliveira C., Hennink W.E., van Steenis J.H., and Berg K. 2006. Photochemically enhanced transduction of polymer-complexed adenovirus targeted to the epidermal growth factor receptor. *J. Gene Med.* **8:** 286–297.

Dietze A., Bonsted A., Høgset A., and Berg K. 2003. Photochemical internalization enhances the cytotoxic effect of the protein toxin gelonin and transgene expression in sarcoma cells. *Photochem. Photobiol.* **78:** 283–289.

Engesæter B.Ø., Bonsted A., Berg K., Høgset A., Engebråten O., Fodstad Ø., Curiel D.T., and Mælandsmo G.M. 2005. PCI-enhanced adenoviral transduction employs the known uptake mechanism of adenoviral particles. *Cancer Gene Ther.* **12:** 439–448.

Folini M., Berg K., Millo E., Villa R., Prasmickaite L., Daidone M.G., Benatti U., and Zaffaroni N. 2003. Photochemical

internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. *Cancer Res.* **63:** 3490–3494.

Høgset A., Prasmickaite L., Tjelle T.E., and Berg K. 2000. Photochemical transfection: A new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **11:** 869–880.

Høgset A., Engesæter B.Ø., Prasmickaite L., Berg K., Fodstad Ø., and Mælandsmo G.M. 2002. Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **9:** 365–371.

Kloeckner J., Prasmickaite L., Høgset A., Berg K., and Wagner E. 2004. Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J. Drug Target.* **12:** 205–213.

Maurice-Duelli A., Ndoye A., Bouali S., Leroux A., and Merlin J.L. 2004. Enhanced cell growth inhibition following PTEN nonviral gene transfer using polyethylenimine and photochemical internalization in endometrial cancer cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3:** 459–465.

Moan J. and Berg K. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53:** 549–553.

Ndoye A., Merlin J.L., Leroux A., Dolivet G., Erbacher P., Behr J.P., Berg K., and Guillemin F. 2004. Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes. *J. Gene Med.* **6:** 884–894.

Ndoye A., Bouali S., Dolivet G., Leroux A., Erbacher P., Behr J.P., Berg K., Guillemin F., and Merlin J.L. 2004. Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **25:** 1575–1581.

Ndoye A., Dolivet G., Høgset A., Leroux A., Fifre A., Erbacher P., Berg K., Behr J.P., Guillemin F., and Merlin J.L. 2006. Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral gene therapy and photochemical internalization. *Mol. Ther.* **13:** 1156–1162.

Prasmickaite L., Høgset A., and Berg K. 2001. Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection. *Photochem. Photobiol.* **73:** 388–395.

Prasmickaite L., Høgset A., Tjelle T.E., Olsen V.M., and Berg K. 2000. The role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation. *J. Gene Med.* **2:** 477–488.

Prasmickaite L., Høgset A., Olsen V.M., Kaalhus O., Mikalsen S.O., and Berg K. 2004. Photochemically enhanced gene transfection increases the cytotoxicity of the herpes simplex virus thymidine kinase gene combined with ganciclovir. *Cancer Gene Ther.* **11:** 514–523.

Prasmickaite L., Høgset A., Selbo P.K., Engesæter B.Ø., Hellum M., and Berg K. 2002. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: A new strategy for cancer therapy. *Br. J. Cancer* **86:** 652–657.

# 第七十四章　原核显微注射技术

Walter Tsark

Transgenic/Knockout Mouse Core Facility，City of Hope Beckman Research Institute，Duarte，California 91010

张文军　译



## 摘要

为了方便与本书中其他构建转基因动物的方法比较，这一章描述了用原核显微注射制备转基因小鼠的技术。原核显微注射，包括注射 DNA 到单倍体原核受精卵，是一个已被广泛接受的技术。构建转基因鼠可用简单的启动子/cDNA，也可用大的包含基因组片段的载体，如黏粒、酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）。制备转基因小鼠的要素是显微刀具制造、小鼠的胚胎制备与培养、原核显微注射及小鼠胚胎移植手术。本章节将对除小鼠胚胎移植外的转基因鼠的制备要素进行说明。本章所述的主要内容在 Mann（1993）、Hogan 等（1994）及 Nagy 等（2003）的著作中有详细描述。

## 引言

转基因这个特定的术语是指将外源 DNA 序列整合到宿主的基因组中（Gordon and Ruddle 1981）。在 PubMed 数据库（www. pubmed. gov）中键入关键词“transgenic mouse and/or knockout”进行搜索，会得到上千条索引，这些文献表明了研究转基因鼠可贵的科学价值。目前，制备转基因鼠的两个最普遍的技术是原核显微注射和用转染的小鼠胚胎干细胞制备嵌合体（如见 Gossler et al. 1986）。在原核显微注射中，用优质的玻璃显微针将转基因序列注射到受精的单倍体小鼠胚胎的原核中。从最初描述原核显微注射法以来，其基本方法没有很大的改变（Gordon et al. 1980），随后的技术改进，使得转基因小鼠的制备效率提高了大约 20%。大约 60%的转基因小鼠来源于胚胎显微注射（Mann and McMahon 1993）。在除小鼠和兔以外的几个物种中原核显微注射已成功运用，但是转染效率较低（Hammer et al. 1985）。与胚胎干细胞的转染相比较，原核显微注射的优点之一是每一个实验直接地产生几个转基因动物。除此，该技术被成功地应用到更宽的构建范围：小 RNA、质粒载体、大的基因组片段载体（黏粒、BAC 和 YAC 载体）。

原核显微注射的不利方面主要在于设备费用，以及要实现熟练操作需要扎实的培训。除此以外，由原核显微注射制备转基因鼠的效率随着实验室所用的小鼠品系不同而变化（Mann and McMahon 1993；Auerbach et al. 2003）。几个自交系，$F_1$ 和 $F_2$ 杂交株一般用来制备转基因鼠［如 C57BL/6J，FVB，（C57BL/60×CBA/J）$F_1$ 或 $F_2$ 杂交系］。不幸的是，不是所有的纯种品系使用时有同样的成功率。这种现象的一个显著的例子是 129s 系，其一般用做基因靶点实验。

Mann 和 McMahon（1993）描述了通过蔗糖密度梯度速率区带离心分离用作转基因注射的 DNA，并证明了这种方法对用于高效制备转基因鼠制备高纯度一致性的 DNA 是最佳的。这种技术的缺点是小的转基因片段与大小相近的载体骨架分离开来会有困难（Sambrook et al . 1998）。这个问题可以通过使用限制性内切核酸酶减小载体片段的大小来解决，限制酶仅切割载体内部序列。用大的片段已经成功地制备出转基因鼠，这种大的片段是从黏粒载体分离出来的，黏粒通过蔗糖密度梯度离心分离得到（Clarke et al. 1998）。大的基因组片段载体如 YAC 和 BAC 使用能够减少 DNA 损伤的方法准备（Hiemisch et al . 1998；Nagy et al. 2003）。这些大的基因组片段载体没有必要在进行核显微注射前线性化。

引入受精卵的转基因趋向于在单一位点多拷贝而不是单拷贝的整合。转基因在异染色质的区域整合进入基因组可能会影响转基因表达（Martin and Whitelaw 1996；Milot et al. 1996）。在启动子内的元素有时候会被甲基沉默（Lettmann et al . 1991；Chevalier-Mariette et al. 2003）。周边的基因结构与染色体绝缘子能帮助减少结合进入异染色质的影响（McKnight et al. 1992）。

成功高效地制备转基因鼠依赖于几个重要的因素：显微注射的技巧、用于显微注射的 DNA 的纯化、胚胎培养条件、显微注射胚胎移植到雌性受体生殖道的成功，及使用的转基因鼠品系的特征。通过原核显微注射的方法制备转基因鼠的技术在 1983 年第一

次得到总结（Gordon and Rudle 1983），在随后的几年其他的一些作者提供了他们对于原始的技术的改进（Gordon 1993；Mann and McMahon 1993；Hogan et al. 1994；Polites and Pinkert 1994；Si-Hoe and Murphy 1999；Nagy et al. 2003）。

## 方案 1

# 显微注射室和显微工具的准备

本方案描述显微注射室与显微工具的准备，由玻璃显微载玻片制作的 Puliv 型的显微注射室（Latham and Solter 1993）容易制作且不昂贵，能在微分干涉（显微镜）和霍夫曼调制相衬（显微镜）上使用（图 1）。显微针（Femtotips II）和固定针（Vacutips，Eppendorf）可从市场购得，加工工具对于大部分实验室是常备的。基本的操作设备能在其他的共同的操作技术中使用（胚胎干细胞进行胚泡，慢性载体的皮下注射）。

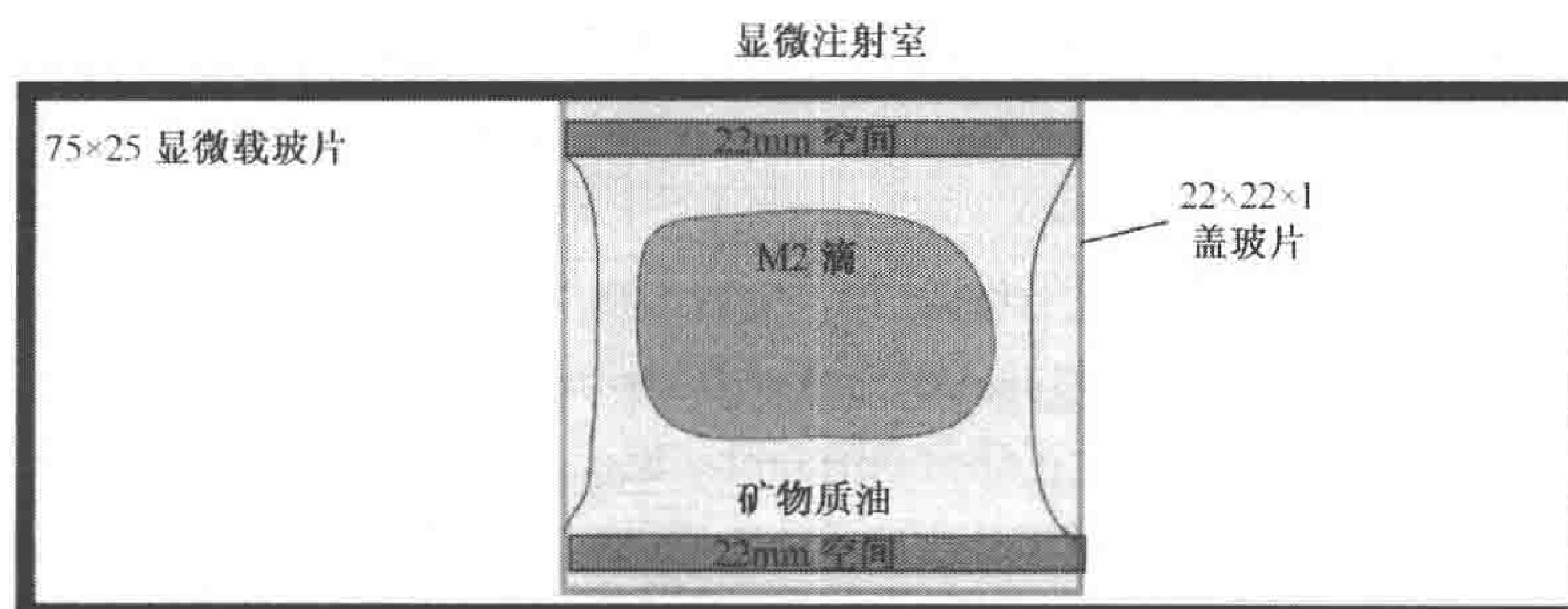



图 1. 待用的显微注射室。300～400μl 的 M2 培养基夹到载玻片与盖玻片之间，轻质的矿物质油将其包围。

## 材料

**注意**：标有<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

无水乙醇（95%和 70%）

盐酸（1%）<!>

SafetyCoat Nontoxic Coating（JTBaker 4017-01）或 Sigmacote <!>（Sigma-Aldrich）

### 仪器

4in 的钝的不锈钢针（Custom order：Hamilton Co.，Reno，Nevada）或者钝的 18G 皮肤穿刺针，连着一段内径为 1/32（0.8in）软管（Saint-Gobain Performance Plastics AJC40001），软管后面安装固定针。

钻石或金刚石笔

符合 DIC 的光学载玻片（25mm×75mm，预先清洁）

真空矽油（Dow Corning 1597418）

微型本生灯

用钝的 18G 针来替换燃烧器，调节本生灯使其发出非常小的火焰。

微型毛细管（100μl）

用钻石或金刚石笔，把毛细管切成 22mm 长（每一个显微注射室准备两段）。

微锻仪（DeFonbrune-type or Narishige-type）配有双目的复合显微镜；10×光学目镜，其中一个装有十字千分尺；物镜 4×、10×和 20×（长工作距离）

装有箱式的铂丝（2.5mm×2.5mm 或 3mm×3mm）的 P-87/P-97 Flaming-Brown 微电极水平拉针仪（Sutter Instruments，Novato California）

塑料球形移液管（可任意使用）

载玻片盒用作无尘储存器

硅胶（GE Silicone II)，真空矽油，或者蜡，把毛细管粘到载玻片

用于固定针的厚壁毛细管（1.0mm OD × 0.58mm ID）（World Precision Instruments，Sutter Instruments）

用于毛细针的薄壁单管有丝毛细管（1.0mm OD × 0.75mm ID）（World Precision Instruments，Sarasota，Florida；Sutter Instruments）

注射器用在硅化时对针产生正压（optional，见步骤 13）

连有 6～8cm 长的软管钝的 18G 皮肤穿刺针（1/32[ID]×3/32[OD]×1/32[wall]）（Saint-Gobain Performance Plastics AJC40001），软管连接到 20cc 可任意处置的有卡式胶筒盖注射器。

## 方法

### 准备显微注射室

1. 用少量硅胶（GE Silicone II）将一段 22mm 长 100μl 的毛细管粘到 25mm×75mm 预先准备好的载玻片上，毛细管与载玻片长边平行，距离边缘 2mm。
2. 在载玻片的另一边相同位置沿着边再粘一根 22mm 长的毛细管，在运行的组织培养箱内过夜干燥胶水。
3. 用 1% 盐酸彻底洗净载玻片，用蒸馏水洗几遍，最后用乙醇清洗。
4. 用可随意使用的塑料球形移液管在载玻片间隔加硅胶溶液，然后用强流蒸馏水冲洗几次。

   SafetyCoat Nontoxic Coating 是最好的，但是 Sigmacote 也可使用。
5. 把显微注射载玻片在组织培养箱中干燥，为防尘放置于塑料载玻片盒中。

### 显微工具制作：拉取胚胎固定针

6. 在距厚壁毛细管（1.0mm OD×0.58mm ID）一端 2/3 处加热 5mm 长一截，拉长到 30mm，使管径在 100～150μm。
7. 在距离固定针较长一端变细点 10～15mm 处用金刚笔切割拉长的细管，把长的部分

与短的部分间折断。

8. 在微锻仪上检查固定针，确保针头是对称的，没有尖或裂缝，确保在显微注射时做好的固定针能把胚胎固定在正确的位置。如果有必要，在微锻仪上用粗丝切断吸管去形成一个对称的面。
9. 用微锻仪的粗丝磨平吸管，并把吸管的开口弄细到 15～20μm，如果有必要，在吸管的凸出部做一个 5°的弯曲以使得固定针能平行于注射室的面进入显微注射滴。
10. 用微型本生灯的火焰烤平固定针粗的一端，但注意不能使开口封闭。

### 显微工具制作：拉显微注射针

11. 用 Sutter Instruments P-97 微电极水平拉针仪制作显微注射针，使用系统默认的参数：Heat = Ramp value；Pull = 50；Delay = 80；Pressure = 200。调节参数制作一个全长 7～9mm 逐渐变细的针，使针管从大约 20μm 迅速地变到最后的 0.5mm。
12. 在微锻仪的玻璃珠上轻轻地削尖针尖，使得吸管尖在 0.2～0.5μm（Mann and McMahon 1993）。
13. 可选择的步骤：在削尖吸管尖之前硅化处理显微注射针，以助于减少细胞物质对针尖的黏附性，增加用单针头注射的卵子的数量。操作如下：
    a. 把针安装到 20cc 的注射器上，注射器连有 10cm 长的 ID 为 1/32 的软管。
    b. 应用注射器的正压，把针尖浸入用 95% 乙醇稀释的 SafetyCoat Nontoxic 无毒涂料中，浸入两次，每次 5s。
    c. 立即用 95% 乙醇冲洗针尖，接着用 70%乙醇，然后浸入 0.22μm 无菌过滤的蒸馏水中。
    d. 干燥针尖，然后按步骤 12 描述在微锻仪上削尖。

### 对固定针和显微注射针的角度调节

14. 在使用 Leica-型显微操纵仪时不要求在拉完显微注射针和固定针后进一步调节角度。在使用 Rail-Mounted Narishige-型显微操作仪时，有必要把显微操作针和固定针的针头做成 30°～35°的弯曲，以使得针尖能平行于显微注射室进入显微注射滴。

## 方案 2

# 准备显微注射的 DNA

本方案描述通过蔗糖密度梯度速率区带离心法准备用于显微注射的 DNA（Sambrook et al. 1989；Mann and McMahon 1993）。

## 材料

**注意**：标有< !>材料的处理方法见附录。

### 试剂

琼脂糖凝胶

乙酸铵（5mol/L）<!>

DNA 显微注射缓冲液（10mmol/L Tris-HCl<!> pH 7.5、0.1mmol/L EDTA、注射用水满足所有 USP Monograph 要求［WFI；Invitrogen］）

使用 0.22μm 的 SFCA 无菌滤器过滤（Millipore）。

乙醇（100%和 95%）

酚：氯仿<!>

质粒

用于消化质粒的限制性内切核酸酶

蔗糖溶液

10%（*m/V*）和 40%（*m/V*）溶于 1mol/L 的 NaCl 中、10mmol/L Tris-HCl pH 8.0、1mmol/L EDTA 用 WFI 水准备。使用 0.22μm 的 SFCA 无菌滤器过滤（Millipore）。

TE 缓冲液（10mmol/L Tris-Cl<!> pH 8.0，1mmol/L EDTA）

### 仪器

Centricon-100 微型浓缩机（Amersham）

梯度形成仪（如 SG30 gradient former；Amersham）

低流动性蠕动泵（0.03～8.2ml/min）（VWR Scientific）

微型离心管（1.7ml，无菌）

若必要，用 0.22μm 的无菌过滤器滤去内毒素的蒸馏水除去尘埃粒子。

针（25G）

橡皮塞

橡皮塞要有 18G 的皮肤穿刺针从塞子的中心由上到下穿过，并且要很适合超速离心机的上部。

超速离心管（Beckman Ultra-Clear 344060）

超速离心机和翻斗式超速离心机转子（如 SW 40 Ti；Beckman-Coulter）

## 方法

1. 用限制性内切核酸酶切割 50μg 质粒，从质粒上释放转基因插入片段。黏粒 DNA 在纯化前用限制性内切核酸酶线性化。
2. 用酚：氯仿抽提，然后用 1 倍体积 5mol/L 乙酸胺、2.5 倍体积的 100%的乙醇沉淀，13 000*g* 离心 30min 以上，然后用 50μg TE 缓冲液悬浮。
3. 按照密度梯度形成仪的说明在超速离心管中倒入两份线性的 10%～40%的蔗糖密度梯度，总体积大约 14ml。
4. 在一支密度梯度离心管中加入切割的 DNA，使用另一支密度梯度管分离其他片段或者作为平衡。
5. 用显微注射缓冲液精确地平衡蔗糖密度梯度管，质粒切割片段在 4℃，35 000r/min 离心 4h；黏粒 35 000r/min 离心 24h。
6. 当超速离心机离心速度开始下降时在架子上放置 80 个灭菌的无菌的 1.7ml 的微型离

心管，在超速离心管的上部插入橡皮塞/针，从蔗糖密度梯度上部移走大约 2ml 包含 DNA 的液体。

7. 把手指放到塞子上开放的位置，然后把 25G 的针推进超速离心管的底部，25G 的针头进入密度梯度液要小于 5mm。用塞子上的针控制流速，在每个收集管内收集大约 0.2ml 的小片段。
8. 每 4 个收集管用琼脂糖凝胶取一个 5μl 等份，确认第一个收集管和最后一个收集管仅包含转基因插入片段。对所有的收集管重复凝胶分析，在凝胶的两边点样孔中分别加入载体＋插入片段及插入片段。
9. 合并所有的仅包含转基因插入片段的收集管，使用 Centricon-100 微型浓缩机用显微注射缓冲液进行 5～7 次连续的缓冲液的改变。对于质粒，收率是开始时 DNA 总量 25%～50%，对于黏粒是 10%～25%。
10. 用分光光度剂精确地测量 DNA 的浓度，在琼脂糖凝胶上分析小样本，同相似大小的标准比较。
11. 4℃存储浓缩的 DNA，用显微注射缓冲液将 DNA 稀释至 2～3μg/ml。在灭菌的、无尘的微量离心管中准备几个 100μl 等份的 DNA 为显微注射用。4℃至多储存一周。备用 DNA 能在－20℃下冷冻，但在显微注射稀释时要小心地完全悬浮 DNA。

## 方案 3

# 超数排卵和胚胎采集

本方案描述胚胎供体雌鼠的超数排卵和胚胎的采集方法，小鼠要保持光照循环，14h 光照，10h 黑暗（如上午 6 点开灯，下午 8 点关灯）。雌性超数排卵的种龄和激素剂量是品系依赖性的，但是几个自交系和杂交系（C57BL/6J，FVB，FI [B6×CBA]）在 3～5 周时超数排卵。

## 材料

**注意**：标有＜ !＞材料的处理方法见附录。

### 试剂

IV-S 型牛睾丸透明质酸酶（10mg/ml；Sigma-Aldrich）在 M2 中（储存液 40×）

在－20℃储存等份。使用前用 M2 稀释至 250μg/ml。

$CO_2$ 用于胚胎供体小鼠安乐死（备选，见步骤 4b）

胚胎供体小鼠

人绒毛促性腺激素（HGG）（Sigma-Aldrich）

用灭菌的 0.9%生理盐水稀释至 500IU/ml，－80℃储存 0.1ml 的等份最多 6 个月。

轻矿物质油（Sigma-Aldrich，用于毒性或胚胎试验的配对检验）。

在松的带盖瓶中在孵箱中保存 30～40ml 矿物质油，使用这种“平衡”矿物质油去覆盖 CZB（一）培养液。

培养基

CZB 培养基：无葡萄糖的碳酸氢钠缓冲液胚胎培养培养基，用做所有的单细胞胚胎培养，不分品系（Chatot et al. 1989）。用盐和灭菌的无内毒素的 $H_2O$ 准备储存溶液（Nagy et al. 2003）。

M2 培养基：HEPES-缓冲液胚胎悬浮培养基（Quinn et al. 1982）。用灭菌的除内毒素的蒸馏水准备（Nagy et al. 2003）或者购买（Sigma-Aldrich of Specialty Media/Chemicon，Temecula，California）。其他的小鼠胚胎培养基（KSOM-AA，M16）能购买（Specialty Media/Chemicon）。

孕马血清促性腺激素<!>（PMSG）（如 Sigma-Aldrich 或 the National Hormone Peptide Program [Dr. A. F. Parlow，Harbor UCLA Medical Center，Los Angeles，California]）。

用 0.9%的灭菌生理盐水，准备 500IU/ml 的储存溶液，－80℃储存灭菌的 0.1ml 等份最多 6 个月。

生理盐水（0.9%，灭菌）作为注射前稀释激素的储存液

仪器

孵箱，事先调到 37℃（humidified，5% $CO_2$）

嘴吸管用做胚胎固定

16～18in 的橡胶管（1/8×3/16×1/32）一端连接 100μl 的毛细管，将附隔离塞吸管尖头尖嘴切去 2～3mm，将其插到橡胶管的另一端，用作胚胎固定针的巴斯德吸管大的末端安到大的附隔离塞吸管尖，另一端为嘴吸管（HPI Hospital Products，Apopka，Florida）。

皮氏培养皿（3cm）

在不同的培养液间移动胚胎时均可照明的立体变焦显微解剖镜（如 Leica MZ7.5）

钟表钳子（Cumont no. 5）（两副），细解剖剪（一副）（World Precision Instruments；Roboz Surgical Instrument Co.，Inc.，Gaithersburg，Maryland）

## 方法

### 胚胎供体小鼠的超数排卵

1. 一般用在原核显微注射实验中来源于小鼠系的雌鼠在开始源发性的发情周期 3～5 周龄前超数排卵，一些品系的小鼠在开始源发性的发情周期后对激素的反应更有效。
2. PMSG 的标准剂量是 5IU/小鼠，在光循环开始后 6～10h 后由腹腔注射给药（如下午 12 点至下午 4 点并在下午 6 点开灯）。对于有些品系的小鼠增加或减少 2.5IU/小鼠，会工作的更好。
3. 在 PMSG 注射 46～48h 后通过腹腔以 5IU/小鼠的剂量注射 HGG 刺激排卵。HGG 的剂量一般要与早期注射的 PMSG 的量相匹配。在注射了 HCG 后胚胎供体雌性小鼠与能繁殖的雄性小鼠立即配对。来源于自交系的雌性小鼠（如 C57BL/6J）正常受精卵的产量可以提高，当其在注射 HCG 4～6h 后不与雄性配对。检测超数排卵的雌鼠阴道内交配栓是交配发生过最强的证据。
4. 受精的单细胞胚胎的恢复与维持按如下描述进行

a. 准备 4 个 3cm 的皮氏培养皿，每个包含 5 排 5 个 10μl 的 CZB 胚胎培养液滴，标上（“Wash1”、“Pre”、“Wash2” 和 “Injected”），用矿物油覆盖，置于 5% $CO_2$/95% 空气的细胞培养箱平衡。在接种胚胎前让平皿在组织培养箱内平衡大于 30min。

b. 经过中间暗周期 10～12h 后，用吸入 $CO_2$ 的方法安乐处死胚胎供体小鼠，或者通过颈椎脱位法。

c. 解剖每只小鼠的输卵管，小心不要撕开被堆积物质包围的包含单细胞卵的子宫胫。

d. 在 HEPES-缓冲的胚胎悬浮培养基 M2 中冲洗每只小鼠的输卵管壁。

e. 准备 0.5ml 包含大约 250μg/ml 的 IV-S 型牛睾丸透明质酸酶的胚胎处理培养基。

f. 从每只小鼠的输卵取堆积物，放入包含透明质酸酶的 M2 培养基滴中，用钟表镊子过撕开子宫胫。

g. 在含有透明质酸酶的液滴中搅动堆积物，直到堆积细胞消失。收集卵细胞，立即用不含有透明质酸酶的 M2 培养基冲洗。动作要快。

h. 在 “Wash1” 培养皿中通过 6 滴冲洗 40～60 组胚胎，然后放一滴在 “Pre” 培养皿中，转移胚胎到 $CO_2$ 孵箱中。原核在经过中间的暗周期 10～14h 将变得清晰可见，显微注射应在检测到原核后尽可能快地进行。

## 方案 4

# 显微注射

本方案描述配制一个显微注射滴的程序和进行原核显微注射。

## 材料

**注意**：标有< !>材料的处理方法见附录。

### 试剂

用于显微注射的 DNA 溶液（准备见方案 2）

用做显微注射的受精卵（准备见方案 3）

氟（Sigma-Aldrich）

氟用来加胚胎固定针当用油加显微注射器。

真空矽油（Dow Corning 1597418）

M2 培养基

包含 CZB 培养基滴的皮氏培养皿（方案 3 的步骤 4a 中准备的 “Wash 2” 和 “Injected” 培养皿）

### 仪器

吸水纸

盖玻片（22mm×22mm×1mm）

胚胎固定针（准备见方案 1）

倒置显微镜（高质量）有 4×明视场，10×明视场，30～40×DIC 或者 Hoffman-Modulation contrast optics 用作显微注射（如 Leica Microsystems，Wexlar，Delaware；NiKon USA，Melville，New York；Olympus America Inc.，Melville，New Yord；Carl Zeiss Imaging Inc.，Thornwood，New York）

26mm×76mm×1.5mm 的槽加工为显微镜座插入物的中心，以精确的线性固定着显微注射室。60mm 或 100mm 的皮氏培养皿的盖子能与霍夫曼调制相差光学镜一起使用。

手动显微注射器控制胚胎固定针的吸入（如 Eppendorf，Narishige）

显微注射室（准备见方案 1）

显微注射针（准备见方案 1）

一对显微操纵器（左和右）

机械的显微操纵仪（Leitz）要求一个带有轨道的底座平面，液压的显微操纵仪（Narishige International，New York）要求有轨道，上面配有显微镜。

巴斯德移吸液管（灭菌的）

吸管架/工具袖

充气防震管（Kinetic Systems Inc.，Boston，Massachusetts）

充气显微注射器械（如 Femtojit Eppendorf AG，Hamburg）

用来从显微注射针移走泡注射器

连着 6～8cm 长的软管（1/32ID×3/32 OD×1/32 wall）（Saint-Gobain Performance Plastics AJC40001）的、钝的 18G 腹腔注射针，软管连接到 20cc 有卡式胶筒盖可随意使用的注射器上。

UV 分光光度计

## 方法

### 构建显微注射滴

1. 若在方案 2 准备的 2μg/ml DNA 溶液被预先冻好，彻底地混合它以保证 DNA 被完全地溶解。用紫外分光光度计检查溶液的浓度（$A_{260}$）。
2. 4℃，14 000$g$ 离心 DNA 溶液 30min，置于冰上。
3. 用真矽油填充显微注射室（准备见方案 1）上部毛细管的两个空间，吸取 300～400μl 的 M2 培养基滴到间隔间，形成椭圆滴。在上面放一个盖玻片，轻轻地推使密封。在液滴周围填充轻质矿物质油（图 1）。
4. 用氟填充胚胎固定针，插针进入工具袖，其与微注射器相连。把工具袖放入显微操作仪。
5. 调节固定针的角度，以便使针尖与显微注射室的表面平行。
6. 用一张吸水纸盖住显微镜台座空白地方，防止液体从固定针流出，滴进显微镜目标。
7. 拉一个灭菌的巴斯德吸液管到 10～12cm 长，直径大约 0.15mm，从上层吸取 DNA 溶液，避开颗粒物质。把加样针插入显微注射针的凸部，吸取 2～5μl DNA 溶液。

8. DNA 溶液不会从注射针内流出，直到所有的气泡被移走。这个过程能通过使用下面方法显著的加快。
   a. 安装 20cc 注射器，注射器连有橡胶管，橡胶管上有塞子，将针粗末端插入塞子。
   b. 弯曲橡胶管，以使针尖向下，运用轻轻拍打针尖时产生的正压驱除所有气泡。
9. 把显微注射针插入工具袖，把工具袖放入显微操作仪。工具袖应该与显微操作仪的固定夹成一排，以便显微工具被作为中心，恰好与显微注射室的长轴平行。调节工具袖的倾斜度，以便显微注射针几乎与显微注射室的表面平行。
10. 调节充气的显微注射针的注射压（Pi）到 70～100hPa，固定压（Ph）到大约 50% Pi。
11. 提升在显微操作室的工具袖直到针尖距离显微注射室的边缘大约 2mm，然后拧紧固定夹。
12. 用几滴轻矿物质油下的 M2 培养基冲洗保存在 37℃，$CO_2$ 孵箱中 CZB 微滴中卵子。
13. 从显微镜底座移走显微注射室，在 M2 滴中心的垂线上沉淀卵子，从液滴的中点开始，延伸到顶部。
14. 在低放大率下，向前推进固定针和显微注射针，直到它们与胚胎一样在一个小的视角内可见。保持固定针与注射针分离，以免损坏针尖。
15. 旋转到 10×物镜，调节固定针和显微注射针的高度，直到它们与胚胎在同一个焦平面，重复调节直到最大的放大率。
16. 固定针尖应几乎触及注射室的表面，应与胚胎在同一个焦平面。调节固定针的角度与倾斜度，以使固定针移动没有明显的震动。

## 原核显微注射

17. 用固定针吸起一个卵子，在高放大率下检查。在一个受精卵中应该仅有两个原核是可见的，在原核内有一个或多个核仁。单个原核暗示着卵子没有受精，卵子内有大于 2 个原核则其不能正常发育。
18. 焦点对准显微注射针，当充气注射器的注射功能激活时，在针尖找一个非常小的旋涡液滴。若没有见到，或许有必要轻轻地把它推进入固定针轻打开针尖。若启动注射功能时在针尖产生一个大的旋流，注射针会引起过量的卵子溶解。如果 DNA 溶液缺乏或过量在进行前换针。
19. 调节卵子的位置，以使较大的原核和固定针的针尖都在准聚焦。

    靶原核应该位于卵子的中心附近，卵子的质膜会很难穿透。理想的，原核将被定位，以使显微注射针在刺穿质膜时不会碰到任何的核仁。

20. 确保胚胎被固定针牢牢地固定，然后放置注射针直到针尖直接在靶原核的下面（6 o'clock），调节针的高度（*z* 轴）直到显微注射针和原核膜恰在同一焦平面。

    原核膜看起来像一条好的环线，核仁通常也在准焦平面内。显微注射针尖可能很难清晰地看见，因此调节针的高度，直到上下边缘锋利可见，然后在针尖处合并为一（图 2，见彩版）。

21. 把针尖放在原核相反的方向，瞄准没有核仁的区域，推进透明带和质膜，以一个单一平稳运动进入原核。一旦当穿刺针穿透透明带与质膜时，卵子的表面会收缩，然

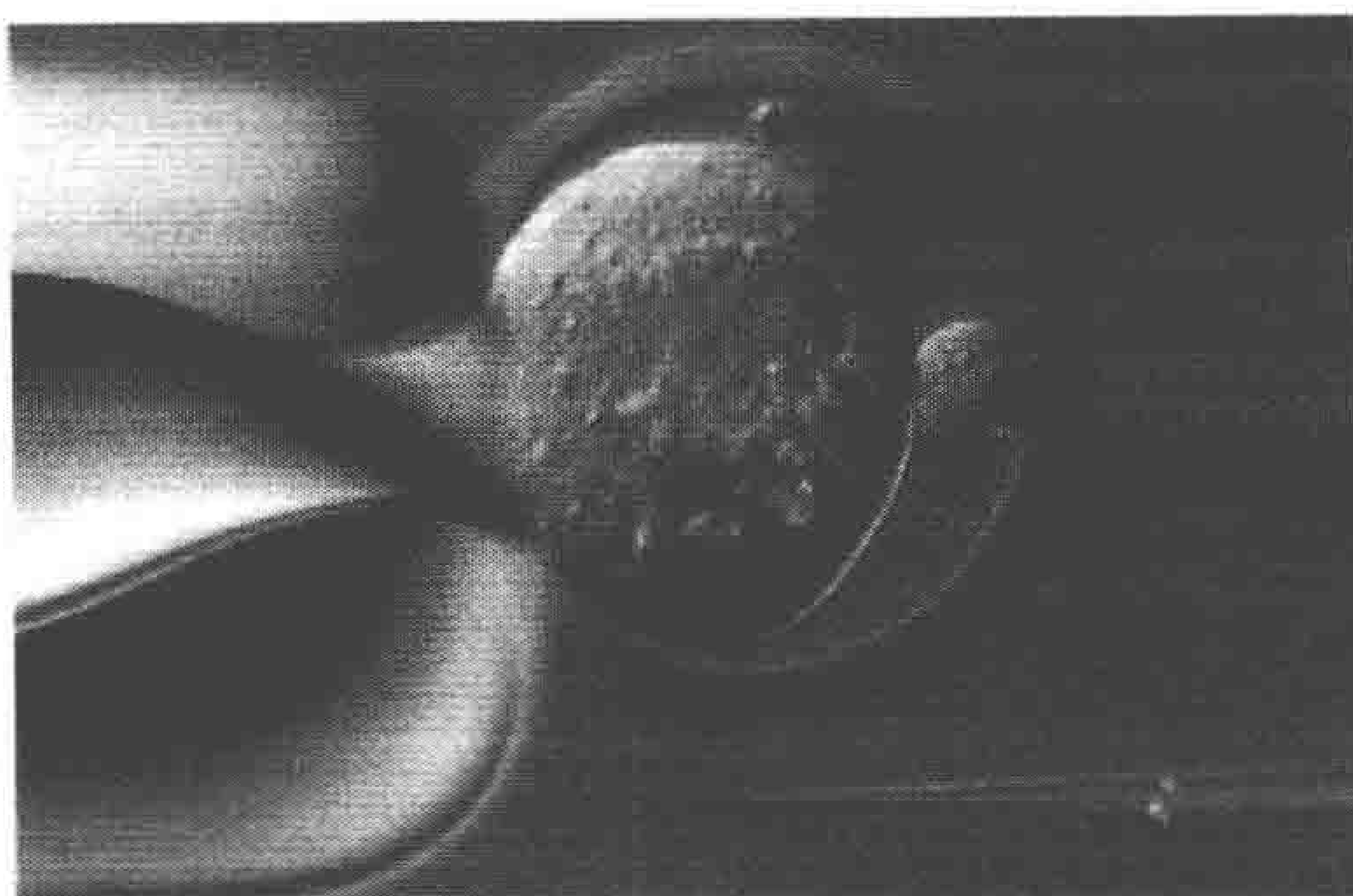


图 2. 相对于固定针原核的正确的位置，显微注射针与原核在等焦平面上的线性排列。

后会反弹形成一个球形面（图 3，见彩版）。继续往前推针，通常是穿过原核，开始注射。若针尖刺破原核膜，原核会随着流入的 DNA 溶液而膨胀（图 4，见彩版）。继续注射，直到原核的体积增大 30%～50%。成功地进行原核注射后，从卵子里迅速地抽出注射针。用清洁功能将针尖净化几次。

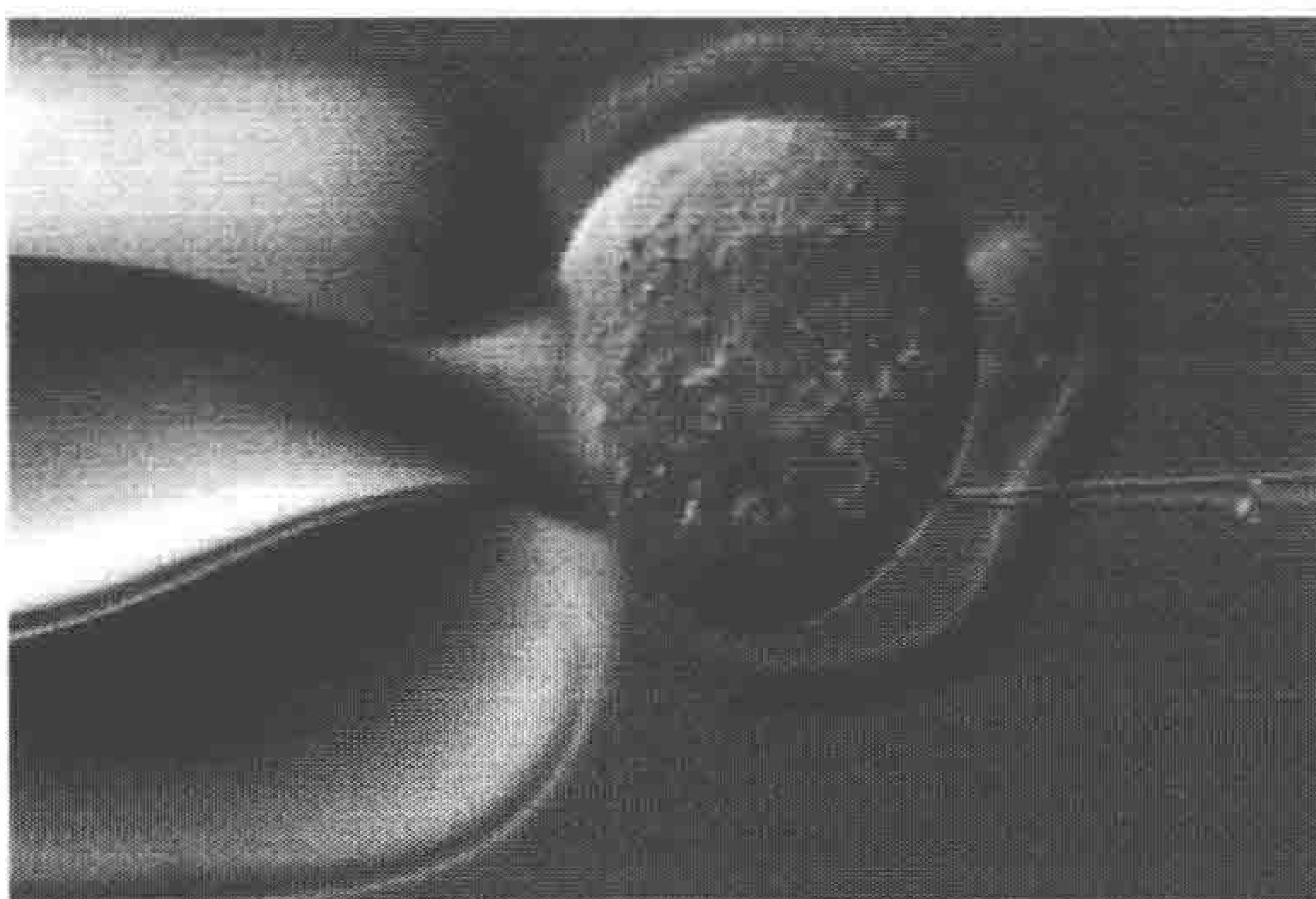


图 3. 显微注射针穿破质膜。注意，当显微注射针穿破质膜时，质膜会“放松”，这样避免了注射针与核仁接触。

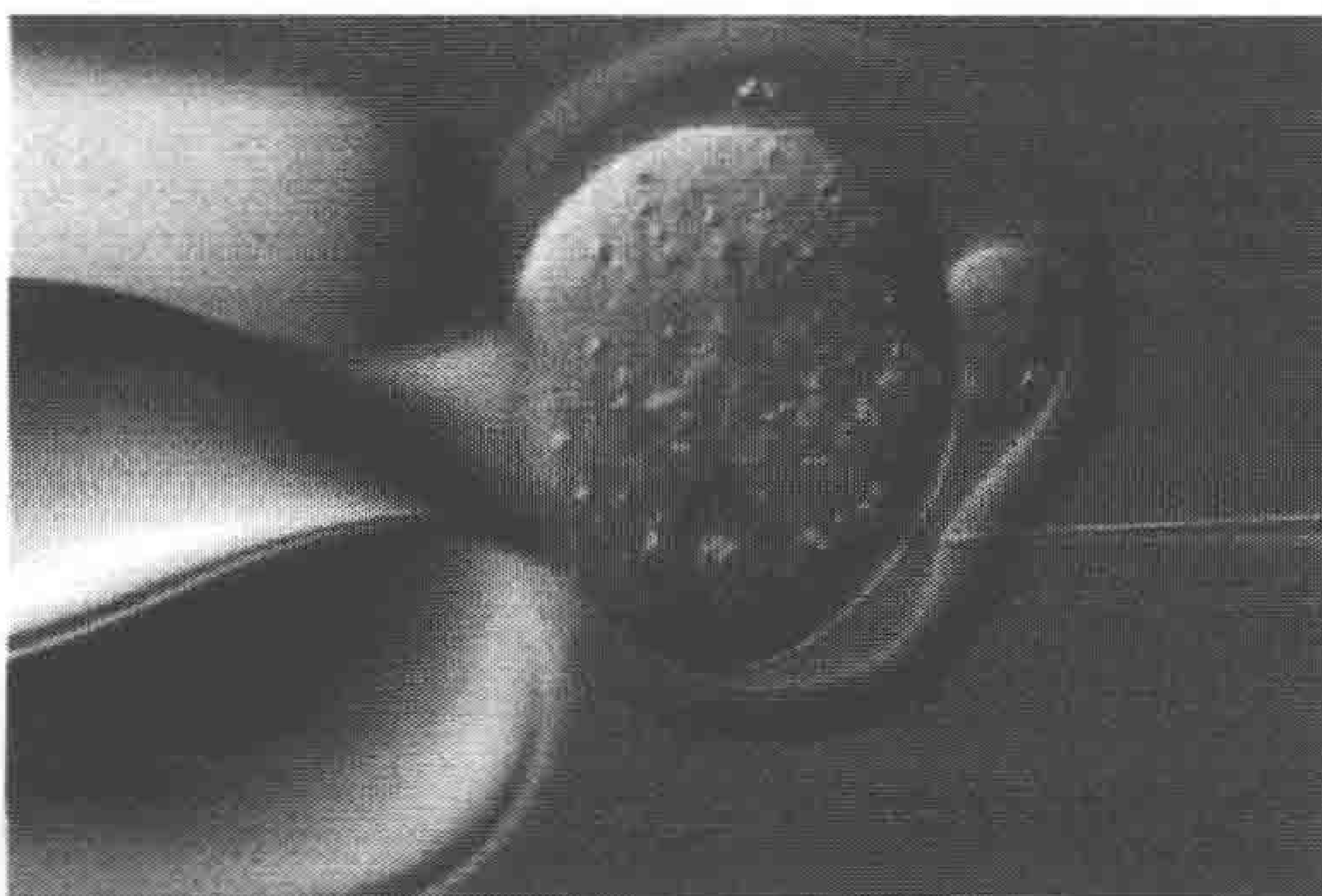


图 4. 成功的原核显微注射。注意，原核随着流入的 DNA 而膨胀。

22. 如果针不能刺穿卵子质膜或者原核膜，小的“气泡”会出现在针尖。如果这种现象发生，从卵子抽出针尖，把原核膜和针尖放到焦平面，重复显微注射过程。

23. 进行显微注射，用5～6滴$CO_2$平衡了的CZB培养基（“Wash2”培养皿）冲洗注射的卵子，培养60min（“Injected”培养皿）去评估生存率（这些培养皿是在方案3的步骤4a中准备的）。

    显微注射后卵子的成活，依赖于个人的技巧及所用的小鼠的品系。典型的，大于90%的卵子在显微注射过程中成活。

# 方案5

# 胚胎移植

本方案描述了假孕受体小鼠的准备和胚胎移植。结扎雄鼠制作的描述在先前列举的几卷中能找到（Hogan et al. 1994；Nagy et al. 2003）。移植单细胞卵子和植入子宫前的胚胎（从双细胞到胚）到假孕受体小鼠输卵管的外科技术，在其他部分已经描述得相当详细（Mann 1993；Hogan et al. 1994；Nagy et al. 2003）。在这里包括一般性的描述。

## 材料

**注意**：标有＜ !＞材料的处理方法见附录。

### 试剂

麻醉剂＜ !＞

已经显微注射的卵子/胚胎（如方案4中）

理想地，经过一个简短的接种显微注射过程存活的卵子移植到0.5dpc（days postcoitus）假孕受体雌性小鼠体内。如果得不到雌性受体小鼠，体外在CZB培养基中培养卵子到多细胞胚胎阶段。

受体雌性小鼠

使用6～9周龄的杂交（如$F_1$或$F_2$ C57BL/6×CBACa/J）或者远交品系。

输卵管结扎雄性小鼠

### 仪器

玻璃移液吸管（120～150um）

揭开假孕受孕小鼠生殖管的工具

立体变焦解剖显微镜光纤照明用做外科胚胎转移（如Leica MZ7.5）

手术针（9mm）

## 方法

### 假孕受孕雌性小鼠的准备

1. 在胚胎移植手术进行的前一晚上，雌性受体与结扎输精管的雄性小鼠配对。

2. 在第二天中午 12 点前，检查雌性小鼠阴道是否存在交配栓。

发现有交配栓的雌鼠终止 0.5dpc，因为交配在暗周期中发生了。

## 把胚胎移植到假孕受孕受体小鼠

3. 麻醉一个 0.5dpc 的假孕受孕雌性小鼠，准备无菌外科手术，通过腹部中央切割手术取出一边的生殖管道。
4. 把卵子/胚胎加入一个 120～150μm 的玻璃移液管中，打孔或小心地撕开卵巢囊，出血最少，把卵子/胚胎移植到子宫囊口。
5. 若有必要，剪开另一侧的腹腔及生殖道，重复上述操作。
6. 用 9mm 的手术针把切口缝起。

根据经验，显微注射胚胎的 20%～40%产生活胎，因此，移植大约 30 个胚胎到雌性受体，会产生合适的数量。

## 致谢

真诚地感谢 Jeffery R. Mann，现在在澳大利亚的 University of Melbourne，他给予我从一代宗师手中学习胚胎移植的科学与艺术的机会。

## 参考文献

Auerbach A.B., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S., and Joyner A.L. 2003. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res.* **12:** 59–69.

Chatot C.L., Ziomek C.A., Bavister B.D., Lewis J.L., and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **86:** 679–688.

Chevalier-Mariette C., Henry I., Montfort L., Capgras S., Forlani S., Muschler J., and Nicolas J.F. 2003. CpG content affects gene silencing in mice: Evidence from novel transgenes. *Genome Biol.* **4:** R53.

Clarke P., Mann J., Simpson J.F., Rickard-Dickson K., and Primus F.J. 1998. Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy. *Cancer Res.* **58:** 1469–1477.

Gordon J.W. 1993. Production of transgenic mice. *Methods Enzymol.* **225:** 747–771.

Gordon J.W. and Ruddle F.H. 1981 Integration and stable germ-line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214:** 1244–1246.

———. 1983. Gene transfer into mouse embryos: Production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol.* **101:** 411–433.

Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., and Ruddle F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77:** 7380–7384.

Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., and Kemler R. 1986. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83:** 9065–9069.

Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., and Brinster R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315:** 680–683.

Hogan B., Beddington R., and Costantini F. 1994. *Manipulating the mouse embryo,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Lettmann C., Schmitz B., and Doerfler W. 1991. Persistence or loss of preimposed methylation patterns and de novo methylation of foreign DNA integrated in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.***19:** 7131–7137.

Mann J.R.M 1993. Guide to techniques in mouse development. *Methods Enzymol.* **225:** 782–793.

Mann J.R.M. and McMahon A.P. 1993. Guide to techniques in mouse development. *Methods Enzymol.* **225:** 771–781.

Martin D.I. and Whitelaw E. 1996. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* **18:** 919–923.

McKnight R.A., Shamay A., Sankaran L., Wall R.J., and Hennighausen L. 1992. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 6943–6947.

Milot E., Strouboulis J., Trimborn T., Wijgerde M., de Boer E., Langeveld A., Tan-Un K., Vergeer W., Yannoutsos N., Grosveld F., and Fraser P. 1996. Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* **87:** 105–114.

Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. *Manipulating the mouse embryo,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Polites H.G. and Pinkert C.A. 1994. Transgenic animal production using DNA microinjection. In *Transgenic animal technology: A laboratory handbook* (ed. C.A. Pinkert), pp. 15–68. Academic Press, San Diego, California.

Quinn P., Barros C., and Whittingham D.G. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **66:** 161–168.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edition, pp. 285–287. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Shashikant C.S., Bieberich C.J., Belting H.-G., Wang J.H., Borbely M.A., and Ruddle F.H. 1995. Regulation of HOXC-8 during mouse embryonic development: Identification and characterization of critical elements involved in early neural tube expression. *Development* **121:** 4339–4347.

Si-Hoe S.L. and Murphy D. 1999. Production of transgenic rodents by the microinjection of cloned DNA into fertilized one-celled eggs. *Methods Mol. Biol.* **97:** 61–100.

# 第七十五章　由沉默慢病毒载体产生的基因下调小鼠

Oded Singer，Gustavo Tiscornia 和 Inder M. Verma

The Salk Institute for Biological Studies，Laboratory of Genetics，La Jolla，California 92037

李永海　译



## 摘要

这一章描述利用慢病毒载体转移基因和小干扰 RNA（siRNA）表达盒到胚胎植入前的晶胚。这一技术使快速转基因动物和转基因下调动物快速发展。

## 引言

为了产生转基因和基因敲除动物，胚胎植入前晶胚必须在体外收获和操作。虽然转基因动物已经通过把 DNA 原核注射到单个的晶胚中产生，但产生基因敲除鼠需要耗费大量时间和精力。必须建立一个胚胎干细胞（ES）敲除系，鉴定和注射到胚泡中来得到首建嵌合体，随后可以繁殖为纯合体。利用慢病毒载体产生转基因动物独特的能力（Lois et al. 2002；Pfeifer et al. 2002）、慢病毒表达短发夹 RNA（shRNA）从聚合酶 III 启动子，如 H1（Tiscornia et al. 2003）和 mU6（Rubinson et al. 2003）能够被用来产生转基因下调鼠。两种方法可用来传递慢病毒颗粒到晶胚来产生慢病毒转基因：卵透明带

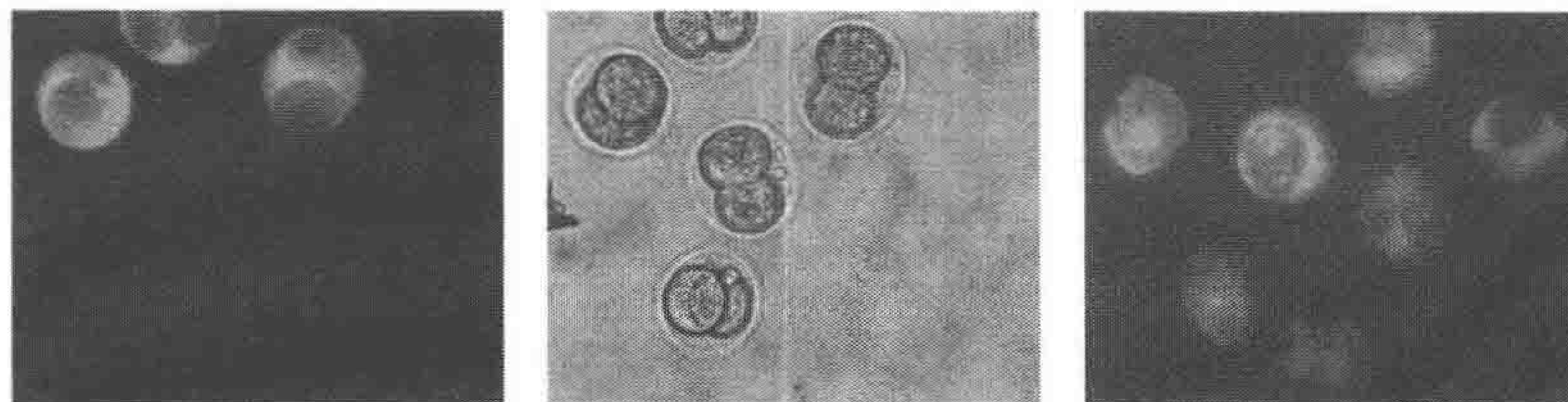


图 1. 用表达绿色荧光蛋白慢病毒载体对单细胞晶胚注射，由 CAG 启动子启动在培养基中培养。（左）荧光照片可见 GFP 阳性晶胚和可见光区（注射后 24h)。（右）可见 GFP 阳性晶胚而且只在荧光下拍照（注射后 72h)。

去除和带下注射。关于收获和操作鼠晶胚的详细的描述参见 Hogan 等的文章（1994）。卵透明带去除技术能够获得高达 100%的转基因（图 1，见彩版）而且对晶胚没有毒性；因此，晶胚的存活率比较高。不过，显微操作的应用需要一些练习。

# 方案

## 卵透明带去除和带下注射的方法

本方案描述了两个用慢病毒载体传递基因和 siRNA 表达盒到胚胎植入前鼠晶胚的方法。

## 方法

**注意**：标记<!>的材料的处理方法见附录。

### 试剂

Acidic Tyrode 溶液

在 80ml 水中混匀以下物质：0.8g NaCl、0.02g KCl<!>，0.024g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$<!>、0.01g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$<!>、0.1g 葡萄糖和 0.4g polyvinylpyrrolidone（PVP）。调节 pH 到 2.5，终体积 100ml。

来源于孕母马血清的促性腺激素（PMS；25IU/ml 盐溶液）（Sigma-Aldrich G 4527）<!>

人绒毛膜促性腺激素（hCG；25IU/ml 盐溶液）（Sigma-Aldrich G 8554）

透明质酸酶 M2 溶液（特殊培养基 MR-051-F）

培养基

M2（特殊培养基 MR-015-D）

M16（特殊培养基 MR-010-D）

鼠

B6D2F1 雌性（6～8 周大；Haarlan）

假孕母鼠，同步化的（交配后 2.5d [dpc]；选择 0.5dpc 进行带下注射）

矿物油（Fischer 0121-1）

用来转基因的病毒（$10^9$个病毒颗粒/ml）

### 仪器

细胞培养用圆形盖玻片

准备吸液管，在本生灯火焰上轻拉硼硅酸盐玻璃毛细管，直到拉出的吸液管外层直径为 80～120μm。用 10μl 毛细管微量吸液管来进行这一步操作（VWR 53432～728）。

准备轻拉硼硅酸盐玻璃毛细管（轻轻在本生灯火焰上）直到尖端内层直径约 200μm。用此 50μl 的微吸液管进行此步操作（VWR 53432～783）。

孵育，预设为 37℃，5%$CO_2$

倒置显微镜
微型离心机
显微操作设备
  Cell-tram 油泵（Eppendorf）用来调节针的把持
  手动的显微操纵器对（Leitz ACS01）用来持针和注射
  微量移液器（ICSI，无菌的）（MIC-cust-0，ID 4～5μm，OD 5～6μm，bevel length 50℃［8～9μm］with a spike Humagen，Virginia）
  Screw-actuated syringe（SAS11/2-E［ZMS］）用来操作注射用针
针（30G）
巴斯德吸液管
立视镜
外科仪器：钝弯钳（2）、细点钳（2）、小剪

## 方法

### 准备待收获晶胚的鼠

1. 注射 8～12 B6D2F1 雌鼠（6～8 周龄，Harrlan）腹腔注射 5 个单位的 PMS。
2. 刚好 48h 注射 5 个单位的 hCG。转移雌鼠到雄鼠的笼中（一只雌鼠一只雄鼠）。
3. 进行卵透明带去除或带下注射。

**卵透明带去除**

a. 注射 hCG 48h 后，无菌条件下手术收集输卵管，转移到一滴 50μl 矿物油覆盖的 M2。插入含一个钝的 30G 的针的漏斗管，用 M2 培养基吹出晶胚（2～4 细胞时期）。用几个连续的 M2 液滴用移液管上下吸取 3～4 次洗晶胚。用 M16 培养基重复此步。迅速操作，孵育晶胚在 37℃直到下一操作步骤。
b. 为了去除卵透明带，转移晶胚到一滴酸性的 Tyrode 溶液中，用移液管上下吸取几次，然后转移到第二滴酸性的 Tyrode 溶液中。室温孵育直到卵透明带溶解（30s～1min）。用巴斯德移液管在矿物油覆盖的 50μl M2 液滴中洗晶胚两次。在矿物油覆盖的 M16 培养基液滴中重复此冲洗操作步骤 3 次。
c. 为了转导病毒颗粒，所用病毒滴定量在 $10^9$ 个病毒粒子/ml。在 M16 中 100 倍稀释病毒。转移晶胚到 30μl 液滴的稀释的病毒溶液中，用移液管上下吹吸几次，然后转移单个的晶胚到一个单独的 10μl 的矿物油覆盖的稀释病毒液滴。37℃，5%$CO_2$孵育 48h。
d. 48h 后，晶胚应当发育为胚泡。用一个转移针转移发育好的胚泡到 2.5dpc 的假孕母鼠的子宫中（Hogan et al. 1994）。

**带下注射**

a. 注射 hCG 24h 后，无菌条件下手术收集输卵管，转移到矿物油覆盖的 50μl 的 M2 液滴中。用一对精细镊轻轻从肿胀的壶腹部（输卵管的上部）释放晶胚（单细胞期），然后转移晶胚到透明质酸酶 M2 溶液，用酶来消化晶胚旁堆集的细胞。转移晶胚到新鲜的 M2 培养基来洗掉透明质酸酶溶液，然后放到一滴 50μl

矿物油覆盖的 M16 培养基中。

b. 解冻一个病毒预分装的（$10^9$ 个病毒粒子/ml）短暂离心（高速离心 5s）阻止细胞碎片堵塞微量移液管的嘴部。

c. 准备显微操作。装好注射针后，点 5μl 病毒悬液到一个细胞培养用圆形盖玻片，用负压通过针头。如果针头堵塞，用短暂的正压气流释放碎片。转移单细胞晶胚到一滴覆盖矿物油的 M16 培养基。

显微注射可以用自制的微量移液管（Lois et al. 2002）或定制的无菌 ICSI 微量移液管。

d. 在倒置显微镜下进行注射操作。把含病毒的微量移液管装到显微操作仪上，把尖端降低到矿物油内直到其尖端在视野下可见。当持针拿住晶胚时打开正压气流，轻轻推微量移液器尖端穿过带层到卵周空间，不要损伤晶胚细胞膜。使尖端保留在带层到卵周空间 5～10s。空间的一些增大表明存在正压。37℃，5% $CO_2$ 孵育晶胚在矿物油覆盖的 M16 培养基中直到移植。

e. 立即移植晶胚到 0.5dpc 同步的假孕母鼠输卵管中或者培养晶胚 2～3d 直到胚泡形成，然后移植到 2.5dpc 同步的假孕母鼠的子宫中。

## 参考文献


Hogan B., Beddington R., Costantini F., and Lacy E., eds. 1994. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., and Baltimore D. 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295:** 868–872.

Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., and Verma I.M. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 2140–2145.

Rubinson D.A., Dillon C.P., Kwiatkowski A.V., Sievers C., Yang L., Kopinja J., Rooney D.L., Ihrig M.M., McManus M.T., Gertler F.B., Scott M.L., and Van Parijs L. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* **33:** 401–406.

Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., and Verma I.M. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1844–1848.

# 附录 注　　意

孙环星　译

## 简要提示

请注意本书中的提示附录是不详尽的。读者应该通过咨询个别厂商和通过别的资源得到最近的和特殊的产品信息。尽管本书中所涉及的化学品和其他物质没有在操作流程中使用表明相应危险物质的符号（!)，但是它们可能对没有特殊防护的使用者是有害的。请参考当地安全机关或厂家的安全指南得到更多的信息。下面的简要提示经常被用到。

- **变得完全相似**在过程开始之前就具有物质的特点。
- **缺少警告**。因为相关信息并不详尽或无法得到相关信息，所以缺少警告并不意味着物质是安全的。
- **如果暴露于有害物质中**立即与当地安全部门联系以得到指导。
- **得到特殊的关于合适的手套的指导**与当地安全部门联系。
- **在处理浓酸和培养基时**要分外小心。戴上护目镜和合适的手套。当处理的量比较大时要戴上面罩。
- 不要把强酸和有机溶剂混合，因为它们可能会发生反应。硫酸和硝酸尤其会发生剧烈的反应而引起火灾和爆炸。

  不要把培养基与卤溶剂混合，因为它们能形成能反应的碳烯而引起爆炸。
- **高压气体容器的处理和储存要当心**。因为它们可能含有易燃、有毒或有腐蚀性的气体，引起窒息的或氧化性气体。
- **千万不要用嘴去吸取溶剂**。这种方法不仅不卫生而且很危险。请用吸管或吸耳球。
- **不要把卤溶剂与非卤溶剂混合**(如在碱性环境下氯仿与丙酮混合后会引起难以预测的反应)。卤溶剂是有机溶剂，如氯仿、二氯甲、三氯三氟代乙烷和二氯乙烷。一些非卤溶剂，如戊烷、庚烷、乙醇、甲醇、苯、甲苯、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜（DMSO）和乙腈。
- **激光辐射**。无论是可见的还是不可见的都能对眼睛和皮肤造成严重伤害，采取恰当的防护避免暴露于直射或反射的激光下。一定按照厂家安全说明操作。看着下面的警告指示灯获取更多的信息。
- **闪灯**。由于它们的光照强度，对眼睛也有一定的伤害。并且有时还可能会爆炸。所以要戴合适的眼罩并按厂家的说明操作。
- **照片定影剂和显影剂**中也包括对身体有害的化学物质。操作时一定要小心并按厂家的规范操作。

- **供电装置和电泳设备**如果操作不当可能会导致严重火灾和电击的危险。
  实验室中的微波炉和高压灭菌器也需要一定的防护。它们在作用中也有可能发生事故（如装在瓶子中的琼脂溶化或灭菌过程）。如果盖子没有完全去掉并且产生的蒸汽没有足够的空间排出，当容器从微波炉或高压灭菌器中取出时能爆炸并导致严重的伤害。通常在高压灭菌或微波前要把瓶盖去掉，常规制备琼脂糖凝胶不需要无菌，可以称出琼脂和溶液放入一个烧瓶里。
- **超声**。利用高频声波（16～100kHz）进行细胞裂解或别的目的。这种超声波在空气中传播时并不对人体直接造成伤害，但是与之相伴的大量的可听到的声音能导致包括头痛、恶心、耳鸣等许多问题，应避免身体与高强度的超声波（并非医疗设备）直接接触。用合适的耳塞保护并在实验室的门上贴上相应的标记。
- **在使用手动切割工具的时候**一定要极度小心，如在使用显微镜用薄片切片机的刀片、解剖刀、剃须刀或针时，显微镜用薄片切片机的刀片非常锋利！在切片时一定要小心，如果不熟悉使用方法，可请别人进行示范。为了正确的操作，可用实验室设专用操作间。在丢弃用过的针头时连同注射器一起丢掉不要遮盖，这将会避免在处理用过的针头时受伤（及可能的感染），因为许多事故都发生在旋转针套时。巴斯德吸管、盖玻片或玻片也可能引起受伤。

## 常用化学药品的一般特性

危险药品的简单目录。

- 无机酸如盐酸、硫酸、硝酸或磷酸是无色有刺激性气味的液体。避免溅到皮肤和衣服上。一旦沾上要用大量的水稀释。这些酸浓度大时可以腐蚀纸张、纺织品及皮肤，而且可能对眼睛造成严重伤害。
- 无机药品如氢氧化钠是白色固体，在溶于水的过程中会释放大量的热，它的浓溶液能缓慢地溶解皮肤甚至指甲。
- 重金属的盐通常为易溶于水的有色粉末状固体。许多是酶的潜在抑制剂，因此对人体和环境有害（如鱼和藻类）。
- 许多有机溶剂为易燃易爆的液体，避免吸入其蒸气，否则会引起恶心和眩晕。同时避免皮肤接触这些液体。
- 其他的有机药品，如有机硫化物和有机胺，有非常难闻的气味。别的药品非常活泼使用时应当非常小心。
- 操作不当，染色剂及其溶液不仅会污染你的样品，而且会污染你的皮肤和衣服。其中的一些是诱导基因突变的（如溴乙非啶）、致癌和有毒的。
- 几乎所有以“ase”结尾的名称都指的是酶（如过氧化氢酶、葡糖醛酰胺酶、消解酶）。也有别的酶并非系统命名（如胃蛋白酶）。许多酶由生产商提供了预装的反应缓冲液等。应当注意这些缓冲物质的各种成分及其特性。
- 有毒物质通常用来处理细胞。它们非常危险要小心使用。
- 要知道上面所列的几种生物有毒物质并没有研究透彻。无论哪种化学品都要小心对待，尽管每种药品的毒性都能被量化［如 LD50（半数致死浓度）值］，但

对致癌和诱导突变的物质或许仅仅一次接触就能受到影响。当然也要意识到特定物质的危险性也与其物理状态有关（粉末相对于大块的晶体，乙醚相对于甘油，干冰相对于处在爆炸压力下的二氧化碳气体）。要能预料试验中在什么样的条件下将会发生什么情况，以及更好的保护自己和环境。

## 有害物质

一般的，私人物品没有在这里列出。器具和别的商业物品以及许多麻醉剂、染料、定影液和染色剂也没有被包括进来。麻醉剂也需要注意。要按照生产商附在产品中的安全说明进行操作。

- **醋氨酚**，吸入、食用或皮肤吸收醋氨酚是有害的。要戴合适的手套和护目镜并且在通风橱中使用。不要吸入其颗粒。
- **冰乙酸**腐蚀性强一定要小心使用。它还可能致癌，其液体和蒸汽能导致身体组织起火。吸入、食用或皮肤吸收都有害。要戴合适的手套和护目镜并且在通风橱中使用，并远离热、闪光和明火。
- **乙腈**性质活泼极易燃烧。它不但是一种刺激物而且能引起窒息，能通过吸入、食用或皮肤吸收产生毒害。一旦沾上按氰化物中毒进行处理。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。乙腈应放置在远离热源、闪光及明火的地方。
- **乙酸铵**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **硫酸铵**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上合适的手套和护目镜。
- **氨比西林（氨苄青霉素）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **麻醉剂**按生产商的安全说明进行操作。
- **Bisbenzimide**（萤光染剂）吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风厨中操作。不要吸入其颗粒。
- **漂白剂**有毒，易爆且能与有机溶剂反应。吸入后可能会引起致死的后果，食用也会造成伤害并且损害皮肤。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作以减少与其接触。
- **硼酸**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（BCIG，X-gal）**对眼睛和皮肤有毒害作用，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **溴酚蓝**吸入后可能会引起致死的后果，食用也会造成伤害并且损害皮肤。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **氯化钙**具吸湿性能引起心脏功能紊乱。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。不要吸入其颗粒。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。

- **二氧化碳**吸入、食用或皮肤吸收可能是致命的。浓度过高时会造成呼吸系统的瘫痪并导致窒息。只能在通风的地方使用。当二氧化碳以固态的形式——干冰存在时，接触后能引起冻伤。不要把大量的干冰放在密闭的空间如冷库里。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **氯化铯（CsCl）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **氯胺**具腐蚀性易燃，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其颗粒。
- **氯霉素**有潜在的致癌作用，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **氯仿**对皮肤、眼睛、黏膜及气管有刺激作用，是一种致癌物而且对肝脏和肾脏有损害。性质活泼。要避免吸入其蒸气。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **氯喹**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。长期接触能导致眼睛永久性伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **胆固醇甲酰氯（氯甲酸胆固醇酯）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **柠檬酸**有刺激性，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。对眼睛有害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **硝酸钴**，剧毒，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。对眼睛有害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **脱羰秋水仙碱（colcemid）**有很高的毒性，如果吸入或吞下会导致器官功能丧失或死亡。能影响生殖系统或胎儿发育。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其颗粒。
- **结晶紫（crystal violet）**能引发火灾。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其颗粒。
- **去氧胆酸（deoxycholate）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。不要吸入其颗粒。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **DAPI** 可能是一种致癌物，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。也可能导致爆炸。不要吸入其颗粒。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **二氯甲烷**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。易爆且可能是一种致癌物。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其蒸气。
- **二乙氨基乙醇（diethylaminoethanol，DEAE）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **二乙基醚（diethyl ether）**极易燃烧和爆炸，对眼睛、皮肤、黏膜有刺激作用，对中枢神经系统有麻醉作用。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。不要吸入其蒸气。在储存或暴露与空气中或受到太阳直射容易产生易爆的过氧基。远离

热源、闪光和明火。

- **二异丙基乙胺（DIEA）**对黏膜、上呼吸道、皮肤和眼睛有极大的伤害。食用或皮肤吸收也是有害的。吸入可能会是致命的。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。远离热源、闪光和明火。
- **双十二烷基二甲基溴化铵（DDAB）**有刺激性且吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **二甲基乙酰胺（DMA）**有毒且可能伤害胎儿。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其烟雾和蒸气。易燃，远离热源、闪光和明火。
- **二甲基甲酰胺（DMF）**可能是一种致癌物，对眼睛、皮肤、黏膜有刺激作用。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。长期吸入对肝脏和肾脏有损害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **二甲基亚砜（DMSO）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作，且易燃。储存在封闭完好的容器中。远离热源、闪光和明火。
- **二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）**是一种强还原剂且味道难闻。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在对其固体或大量样品操作时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中进行。
- **1，4-二氧己环（1，4-dioxane）**在液态和气态时易燃，可能是一种致癌物且吸入、食用或皮肤吸收后有剧毒。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。远离热源、闪光和明火。
- **5，5′-二硫双（2-硝基苯甲酸）（DTNB）**一种刺激物，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **乙醇**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **溴化乙啶（ethidium bromide）**有效的诱导基因突变剂且有毒，咨询当地安全部门以得到特殊的操作和处理过程。不要吸入其颗粒。当对含有这种燃料的液体进行操作时要戴上合适的手套。
- **乙酸乙烷（ethyl acetate）**食用会致命，吸入或皮肤吸收会受害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。在通风的地方使用。
- **1-乙基-3-［3-(二甲胺基）丙基］碳二亚胺盐酸盐（EDC）**对黏膜和上呼吸道有刺激作用。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。在操作时要小心。
- **核酸外切酶 III** 吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **甲醛**毒性很高且易爆。也可能是一种致癌物，能通过皮肤吸收且对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有刺激和破坏作用。避免吸入其蒸气。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。远离热源、闪光和明火。
- **甲酰胺**能致畸。蒸气对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有刺激作用。吸入、食用

或皮肤吸收都会产生伤害。在对其浓溶液操作时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中进行。操作中尽可能使溶液保持密封。

- **G418** 有毒且可能伤害胎儿。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其颗粒。
- **戊二醛**有毒能被皮肤吸收且对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有刺激和破坏作用。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **甘氨酸**吸入、食用或皮肤吸收都可能会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **氯化金**溶液（gold chloride solution）有刺激性且吸入、食用或皮肤吸收都可能会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **盐酸胍**对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有刺激作用。吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **盐酸**易爆，吸入、食用或皮肤吸收都会产生致命的伤害。对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有极大的刺激作用。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。在对大量的盐酸进行操作时要戴护目镜。
- **潮霉素 B** 毒性很高且吸入、食用或皮肤吸收都会产生致命的伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。不要吸入其颗粒。
- **四氯二苯基苷脲（iodogen）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其颗粒。
- **异戊基乙醇（IAA）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害，并可能使眼睛严重受损。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。远离热源、闪光和明火。
- **异氟醚（isofluorane）**是一种刺激物，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。长期接触有害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **异丙醇（isopropanol）**易燃有刺激性，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。不要吸入其蒸气。远离热源、闪光和明火。
- **异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。
- **卡那霉素**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套。只能在通风的地方使用。
- **酮洛芬（ketoprofen）**有毒，吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **液氮**由于温度极低能导致严重的伤害。操作时要尤其小心。不要吸入其蒸气。可能的话使用带圆环的小瓶。不要让液氮溅到你的衣服上。
- **氯化镁**吸入、食用或皮肤吸收都会产生伤害。在使用时要戴上护目镜和合适的手套并且一定在通风橱中操作。
- **硫酸镁（magnesium，$MgSO_4$）**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **马来酰亚胺（maleimide）**，伤害极大，可通过吸入、吞食或皮肤吸收致死。不

要吸入其粉尘。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。

- **β-巯基乙醇**［**β-mercaptoethanol**（**2-mercaptoethanol**），**HOCH2CH2-SH**］，通过吸入或皮肤吸收可致死，吞食的伤害很大。高浓度的情况下对黏膜、上呼吸道、皮肤和眼睛极具伤害性。β-巯基乙醇气味很难闻。不要吸入其粉尘。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **甲醇**（**methanol**，**MeOH** 或 **$H_3COH$**），有毒，可导致失明，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。为了防止暴露性蒸发适当的通风是有必要的。避免吸入蒸气。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **米非司酮**（**mifepristone**），有毒，会对胎儿造成伤害，降低生殖力。对女性生殖系统造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入其粉尘。
- **氮气**（**nitrogen**）（气态或液态），可能通过吸入、吞食、或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。参考当地安全办公室的操作规程。
- **三氯化锇**（**osmium tetroxide**）［**四羟化锇**（**osmic acid**）］，**$OsO_4$**，强毒性，可能通过吸入、吞食、或皮肤吸收造成伤害。蒸气可以与角膜组织发生反应引起失明，造成不可挽回的后果。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。避免吸入蒸气。
- **胰腺核酸内切酶 I**（**pancreatic endonuclease I**），可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时需戴手套和护目镜。
- **多聚甲醛**（**paraformaldehyde**），致命毒性，可能致癌，易通过皮肤吸收，对皮肤、眼睛、黏膜和上呼吸道极具伤害性。避免吸入粉尘或蒸气。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。远离热源，火花和火源。
- **青霉素 G**（**penicillin G**）**普鲁卡因盐**（**Procaine salt**）引发呼吸道和皮肤的过敏反应，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套。避免吸入粉尘。
- **吩嗪硫酸甲脂**（**phenazine methosulfate**，**PMS**），刺激物，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **苯酚**（**phenol**），极毒，强腐蚀性，造成严重化学灼伤。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，穿着防护服并戴手套和护目镜。先用大量水冲洗，再用肥皂水、清水洗涤接触毒物的皮肤。切勿使用乙醇。
- **苯甲基磺酰氟**（**phenylmethylsulfonyl fluoride**，**PMSF**），分子式为 $C_7H_7FO_2S$，强毒性胆碱酯酶抑制剂。严重损害呼吸道黏膜、眼睛及皮肤，吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。一旦眼睛或皮肤接触了 PMSF，应立即用大量水冲洗之并丢弃被污染的衣物。
- **磷钨酸**（**phosphotungstic acid**），引起致命的疼痛刺激。通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。避免吸入其粉尘。
- **聚乙二醇**（**polyethyleneglycol**，**PEG**），可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入蒸气。
- **聚氮丙啶**（**polyethylenimine**，**PEI**），造成眼睛皮肤灼伤，可能通过吸入、吞食

或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。

- **聚乙烯醇（polyvinyl alcohol）**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **氯化钾（potassium chloride，KCl）**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **铁氰化钾（potassium ferricyanide）**，分子式为 $K_3Fe(CN)_6$，吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。远离强酸。
- **亚铁氰化钾（potassium ferrocyanide）**，分子式为 $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$，吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。远离强酸。
- **焦磷酸钾（potassium phosphate）**，$K_2HPO_4$/$KH_2PO_4$，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入粉尘。$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 是二价的，$KH_2PO_4$ 是单价的。
- **蛋白酶 K（proteinase K）**，刺激物，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **嘌呤霉素（puromycin）**，有毒，可能致癌。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时需戴手套和护目镜。
- **放射性物质（radioactive substance）**：当实验中要用到放射性物质时，需事先了解同位素的物理化学性质（半衰期、放射类型、能量）、放射性物质的化学形式、放射性浓度（特定的活性）、总量及其化学浓度。定购和使用时要尽可能的适量。操作时需戴合适的手套、穿实验服、戴护目镜。X 射线和 γ 射线是波长很短的电磁波，由相应机器产生或放射性物质释放产生。它们由放射源等方向的散射或者被聚集成束。它们潜在的危险程度依赖于暴露的时间、强度以及所使用的波长。恰当的防护通常是铅或者类似的材料。防护的厚度由 X 射线或 γ 射线的强度而定。请咨询当地安全实验室以得到更多的正确使用和暴露在放射性材料时的指导。总是在使用完放射性同位素后彻底检测。一种方便的常规检测放射性的方法可以参见 http://graphpad.com/quickcalcs/index.cfm/。
- **核糖核酸酶 A（RNase A）**，刺激物，使用时须戴手套和护目镜。避免吸入其粉尘。
- **硅烷（silane）**，极易燃的腐蚀剂。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。远离热源，火星和明火。蒸气刺激眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **叠氮化钠（sodium azide）**分子式为 $NaN_3$，强毒性，呼吸抑制剂。$NaN_3$ 溶液必须作明显标记。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中小心操作，并戴手套和护目镜。$NaN_3$ 是氧化剂须远离易燃物品放置。
- **硼氢化钠（sodium borohydride）**，分子式为 $NaBH_4$，腐蚀易燃，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时需在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **甲次砷酸钠（sodium cacodylate）**，含有砷，可能致癌。强毒性，吸入、吞进或

通过皮肤吸收后有致命危险。会对胎儿造成伤害。接触或吸入会有缓发的影响。避免吸入粉尘。使用时必须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。参见甲次砷酸盐。

- **脱氧胆酸钠（sodium deoxycholate）**，刺激黏膜，呼吸道，处理粉末时，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入粉尘。
- **脱氧胆酸钠（sodium deoxycholic acid）**，参见脱氧胆酸钠（sodium deoxycholate）。
- **磷酸二氢钠［sodium dihydrogen phosphate，$NaH_2PO_4$（磷酸钠，单价）］**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）**，有毒，有刺激性，对眼睛伤害很大。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入粉尘。
- **磷酸氢二钠［sodium hydrogen phosphate，$Na_2HPO_4$（磷酸钠，二价）］**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **氢氧化钠（sodium hydroxide，NaOH）**，NaOH溶液有强毒性和腐蚀性，须小心使用，戴手套和面罩。所有其他高浓度碱均需按照此要求操作。
- **次氯酸钠（sodium hypochlorite，NaOCl）**参见漂白剂（bleach）。
- **Spurr's resin** 包括致癌和有毒的化学药品。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **链霉素（streptomycin）**有毒，可能致癌，会引起过敏反应。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **硫酸（sulfuric acid，$H_2SO_4$）**，强毒性，对黏膜和上呼吸道、眼睛、皮肤极具伤害性。它可以燃烧，并且与其他材料（如纸张）接触可导致火灾。使用时须在通风橱中操作，穿白大褂并戴手套和护目镜。
- **四环素（tetracycline）**，可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **三乙胺（triethylamine）**可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和护目镜。
- **三氟乙酸（trifluoroacetic acid，TFA）**（高浓度），可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。高浓度酸必须小心使用。分解会产生有毒的烟雾。使用时须在通风橱中操作，并戴手套和面罩。
- **Tris** 可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **磷酸三钠（trisodium citrate）**，参见柠檬酸（citric acid）。
- **吐温 X-100（Triton X-100）**，对眼睛有强烈的刺激和灼痛感。使用时须戴手套和护目镜。避免吸入蒸气。
- **胰酶（trypsin）**可以导致过敏反应。可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。避免吸入粉尘。使用时须戴手套和护目镜。使用时适当通风。

- **尿素**（**urea**），可能通过吸入、吞食或皮肤吸收造成伤害。使用时须戴手套和护目镜。
- **X-gal**，在处理粉末时，可能对眼睛和皮肤有毒。注意 X-gal 的储存液的溶剂是 DMF，一种有机溶剂。细节请参见二甲基甲酰胺，也参见 BCIG。

# 索　引

［Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝基因转移ＤＮＡ和ＲＮＡ的转运与表达＝ＧＥＮＥ ＴＲＡＮＳＲＥＲ ＤＥＬＩＶＥＲＹ ＡＮＤ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＯＦ ＤＮＡ ＡＮＤ ＲＮＡ Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ
作者＝（美）Ｔ．弗里德曼，Ｊ．罗西主编；殷勤伟等译
页数＝６７８
ＳＳ号＝１４０７６１２５
ＤＸ号＝
出版日期＝２０１６．０７
出版社＝科学出版社